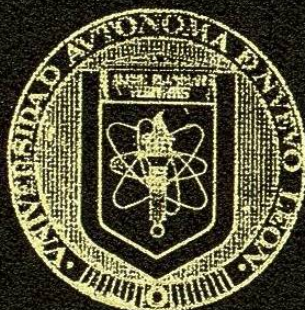


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE
LIBRE Y ATRAPADA EN LIPOSOMAS EN UN MODELO
DE LINFOMA SUBCUTANEO MURINO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

Por

Q.B.P. YOLANDA GUTIERREZ PUENTE

Monterrey, N. L.

Marzo de 1997

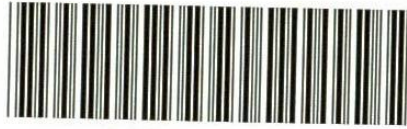
TM

Z5320

FCB

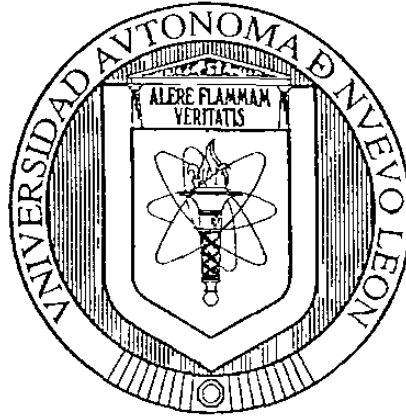
1997

G8



1020118499

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE LIBRE Y ATRAPADA EN
LIPOSOMAS EN UN MODELO DE LINFOMA SUBCUTANEO MURINO**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN INMUNOBIOLOGIA**

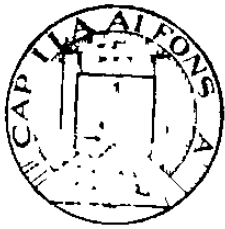
POR

Q.B.P. YOLANDA GUTIERREZ PUENTE

Monterrey, Nuevo León.

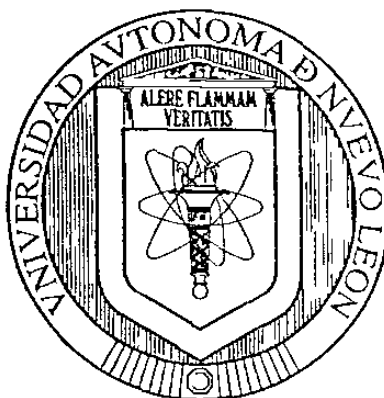
Marzo de 1997

M
Z 20
F H
4
58



FONDO TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE LIBRE Y ATRAPADA EN
LIPOSOMAS EN UN MODELO DE LINFOMA SUBCUTANEO MURINO

COMISION DE APROBACION DE TESIS

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Director de Tesis

M.C. Juan Manuel Alcocer Gzz.
Co- Director de Tesis

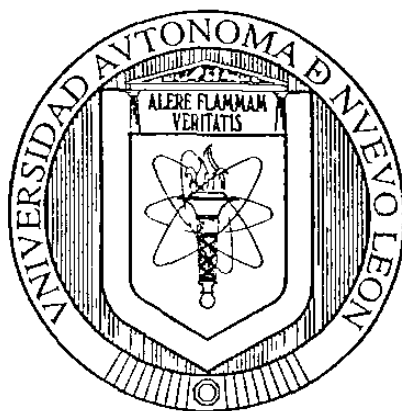
Dra. Julia Verde Star
Subdirectora de Postgrado

[Handwritten signatures of the thesis committee members over three horizontal lines]

Monterrey, Nuevo León.

Marzo de 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE LIBRE Y ATRAPADA EN
LIPOSOMAS EN UN MODELO DE LINFOMA SUBCUTANEO MURINO

COMISION DE EXAMEN

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Presidente

M.C. Juan Manuel Alcocer Gzz.
Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Vocal

Monterrey, Nuevo León.

Marzo de 1997

LOCALIZACION

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y VIROLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS BAJO LA DIRECCION DEL DR. REYES TAMEZ GUERRA Y LA CO-DIRECCION DEL M.C. JUAN MANUEL ALCOCER GONZALEZ.

DEDICATORIA

A mis padres :

Rubén y María de los Angeles

Porque gracias a su amor , apoyo y esfuerzo he podido seguir adelante.

A mis hermanos :

Alicia, Héctor, Rubén, Beatríz y Lourdes

Por su cariño y motivación que siempre me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Reyes S. Tamez Guerra por su invaluable apoyo y asesoría, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este trabajo y por motivarme a seguir adelante en mi formación profesional.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por sus acertados comentarios en la revisión del escrito de la tesis.

Al M.C. Juan Manuel Alcocer por su asesoría y consejos durante el desarrollo de la tesis y por su perseverancia para poder culminar esta etapa.

Al M.C. Pablo Zapata por su amistad, sus enseñanzas en el trabajo de laboratorio y por su ayuda incondicional.

Al Q .B.P. Eugenio Román Calderon por su apoyo constante, y por permitirme compartir sus conocimientos y su área de trabajo durante el escrito de esta tesis.

A mis amigos Arturo, Silvia y Tony por estar conmigo en todo momento y por enseñarme el verdadero significado de la amistad.

A los miembros del laboratorio de Patología Molecular (INIFAP-UANL) por las facilidades que me otorgaron para utilizar parte de su equipo de trabajo con permanente disponibilidad.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología y Virología, y en especial al Departamento de Bioquímica por todo el apoyo recibido.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la elaboración de este trabajo y que sin intención omito.

INDICE

	pág.
LOCALIZACION	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	1
IMPORTANCIA	3
INTRODUCCION	6
ANTECEDENTES	
I. Mecanismos de Inmunidad Contra Tumores	8
II. Propiedades Biológicas de la Interleucina-2	12
III. Uso de la Interleucina-2 en Inmunoterapia de Cáncer	
Experimental	13
IV. Propiedades Generales de los Liposomas	22
V. Inmunomoduladores Encapsulados en Liposomas	32
VI. Interleucina-2 Atrapada en Liposomas	33

HIPOTESIS	37
OBJETIVOS	38
DIAGRAMA DE FLUJO	39
MATERIAL Y METODO	40
RESULTADOS	44
DISCUSION	62
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS	68
BIBLIOGRAFIA	69

INDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla No. 1	18
Efectividad de Tratamientos Utilizando Células LAK e IL-2 en Cáncer Humano	
Tabla No. 2	19
Efectividad de Tratamientos Utilizando IL-2 en Cáncer Humano	
Tabla No. 3	20
Efectividad del Tratamiento de Cáncer Humano Utilizando IL-2 en Combinación con Otras Citocinas	
Tabla No. 4	21
Efectos Tóxicos de la IL-2 en el Tratamiento de Cáncer Humano	
Tabla No. 5	26
Sistemas Acarreadores de Drogas en Biomedicina	
Tabla No. 6	27
Propiedades Generales de los Liposomas	
Tabla No. 7	55
Efecto de Diferentes Dosis y Vías de Administración de IL-2 en la Supervivencia de Ratones Portadores del Linfoma L-5178Y	

Expresión Local y Sistémica de Citoquinas en Ratones BALB/c
Tratados con IL-2 Recombinante Atrapada en Liposomas

INDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura No. 1	23
Estructura General de los liposomas	
Figura No. 2	29
Mecanismos de Interacción de los Liposomas con la Célula	
Figura No. 3	47
Efecto de Diferentes Dosis del Linfoma L-5178Y en la Sobrevivencia de Ratones BALB/c	
Figura No. 4	48
Efecto de la IL-2 Intravenosa en Ratones BALB/c con Linfoma L-5178Y	
Figura No. 5	49
Efecto de Diferentes Dosis de IL-2 Intravenosa en Ratones BALB/c con Linfoma L-5178Y	
Figura No. 6	50
Efecto de 20000 U de IL-2 Libre y Liposomal Via Intravenosa en Ratones BALB/c con Linfoma L-5178	

Figura No. 7	51
Efecto de 20000 U de IL-2 Libre y Liposomal Via Intratumoral en Ratonés BALB/c con Linfoma L-5178Y	
Figura No. 8	52
Efecto de 5000 U de IL-2 Libre y Liposomal Via Intravenosa en Ratonés BALB/c con Linfoma L-5178Y	
Figura No. 9	53
Efecto de 5000 U de IL-2 Libre y Liposomal Via Intratumoral en Ratonés BALB/c con Linfoma L-5178Y	
Figura No. 10	54
Monitoreo del Peso de Ratonés BALB/c con Linfoma L-5178Y Tratados con 5000 U de IL-2 Liposomal Via Intratumoral	
Figura No. 11	57
Efecto Antitumoral de la Interleucina-2 Recombinante Atrapada en Liposomas	
Figura No. 12	58
Expresión de G3PDH Local y Sistémica en Ratonés Tratados con IL-2 Recombinante en Liposomas	
Figura No. 13	59
Expresión de IL-12 Local y Sistémica en Ratonés Tratados con	

IL-2 Recombinante en Liposomas

Figura No. 14 60

Expresión de IL-4 Local y Sistémica en Ratones Tratados con
IL-2 Recombinante en Liposomas

Figura No. 15 61

Expresión Local y Sistémica de Citoquinas en Ratones Tratados
con IL-2 Recombinante en Liposomas

RESUMEN

La inmunoterapia representa actualmente una alternativa para el tratamiento del cáncer, con algunas ventajas sobre la terapia convencional, como son la especificidad y ausencia de efectos secundarios en la mayoría de los casos. La Interleucina-2/(IL-2) recombinante es una de las citoquinas más ampliamente utilizada en la Inmunoterapia de tumores sólidos, dada su capacidad de activar algunos sistemas citotóxicos antitumorales del huésped. Los estudios clínicos que se han realizado indican que la IL-2 presenta un efecto antitumoral importante en esquemas de dosis que generalmente producen efectos tóxicos. Debido a su elevada toxicidad es necesario desarrollar mecanismos para disminuir estos efectos, manteniendo o aumentando la actividad antitumoral. En este trabajo se planteó la hipótesis de que la encapsulación de IL-2 en liposomas biodegradables puede incrementar la actividad de la IL-2 recombinante, y disminuir o eliminar los efectos tóxicos en un modelo murino de cancer experimental. Para probar dicha hipótesis se desarrollo un modelo experimental en ratones BALB/c inoculando en forma subcutánea 2.5×10^6 células de linfoma L-5178Y el cual produce un tumor con crecimiento local progresivo que termina diseminándose a otros tejidos ocasionando una mortalidad mayor al 90% a los 30 días después de la inoculación de las células tumorales. Bajo estas condiciones se manejaron diferentes dosis, tiempos y vías de administración de la IL-2 recombinante libre y atrapada en liposomas. La administración de 10000, 20000 y 40000 U de IL-2 libre por vía intravenosa (i.v) no modificaron el periodo de sobrevivencia en los ratones portadores del tumor; a excepción de la administración de 20000 U por vía intratumoral (i.t), que producen un efecto antitumoral con una sobrevivencia del 40%. Con la administración de 5000 U de IL-2 libre no se obtiene ningún efecto antitumoral, mientras que la administración de 5000 U de IL-2 encapsulada en liposomas origina un 60% de sobrevivencia por vía i.v y un 70% por vía i.t, observándose en estos grupos de trabajo que la destrucción de los tumores se debe principalmente a una reacción de necrosis. Los datos obtenidos indican que los liposomas pueden incrementar la actividad antitumoral de la IL-2 recombinante. La expresión de citoquinas TH1 y TH2 local y sistémica indicó que el efecto antitumoral de la IL-2 puede ser mediado por la producción sistémica y local de la IL-12. Esta citoquina tiene la capacidad de inducir la activación de

linfocitos T citotóxicos, así como la IL-4 producida localmente. El efecto antitumoral de la IL-2 libre y atrapada en liposomas puede ser mediado por la producción de citoquinas capaces de inducir la activación de linfocitos T citotóxicos.

IMPORTANCIA

El control y tratamiento del cáncer por medio de la manipulación del sistema inmunológico fué sugerido desde principios de siglo. Actualmente el tratamiento inmunoterapéutico del cáncer se fundamenta en que cualquier diferencia molecular entre una célula normal y una célula neoplásica puede ser utilizada como blanco para la destrucción selectiva de esta última por medio de los mecanismos efectores del sistema inmune, los mismos que con una delicada especificidad reconocen y discriminan lo extraño de lo propio.

En los últimos años ha resurgido el interés por afrontar el tratamiento y prevención del cáncer desde el punto de vista inmunológico. es decir, el estudio de los mecanismos de defensa del organismo que participan de manera importante en el control de las neoplasias, así como la investigación de diferentes sustancias con capacidad inmunoterapéutica, a las que se les ha denominado “inmunomoduladores” o en una forma más general como “modificadores de la respuesta biológica”; el impulso que han tomado estas alternativas ha sido además motivado por la falta de actividad específica antitumoral de la quimioterapia y radioterapia.

Actualmente las estrategias para el tratamiento inmunoterapéutico del cáncer, son divididas en: Inmunoterapia activa (específica e inespecífica) y la Inmunoterapia pasiva. La inmunoterapia activa se refiere a la inmunización del huésped que presenta el tumor con agentes capaces de generar una respuesta inmunológica que elimine o reduzca el volumen del tumor. La inmunoterapia pasiva involucra la transferencia al huésped que presenta el tumor, de mediadores inmunológicos obtenidos de otros organismos, como por ejemplo anticuerpos o células con la capacidad de mediar una respuesta antitumoral específica.

De este principio se deriva una de las modalidades más recientes para el tratamiento del cáncer denominada “INMUNOTERAPIA ADOPTIVA” la cual consiste en la transferencia al huésped de linfocitos activados *in vitro* con Interleucina-2/(IL-2), la cual puede ser

obtenida por medio de la tecnología de DNA recombinante, representando el aporte más importante que ha hecho posible este tipo de inmunoterapia.

El análisis del efecto terapéutico de la IL-2 se realizó primeramente en forma extensiva en modelos animales donde se demostró que el tratamiento era capaz de inhibir la metástasis de diferentes tipos de tumores. Posteriormente se demostró en estos mismos modelos que la combinación de IL-2 con células citotóxicas (LAK y CTL) producía mejores efectos terapéuticos que cualquiera de los tratamientos por separado.

La IL-2 tiene también un gran potencial para restaurar los defectos en la función de los linfocitos T relacionados con la producción endógena, nula o deficiente, de IL-2. Por ejemplo, un gran número de pacientes con cáncer, especialmente los de cáncer avanzado, tienen un defecto sustancial en algunas de las funciones de linfocitos T, particularmente en las respuestas proliferativas que son mediadas por IL-2. Además de restaurar las condiciones de inmunodeficiencia anteriormente mencionadas, la administración exógena de IL-2 en pacientes con cáncer, tiene un especial potencial dado que induce la proliferación de linfocitos T *in vivo*, mantiene su especificidad funcional e induce sistemas citotóxicos antitumorales mediados por linfocitos T (Células LAK, TIL y Linfocitos T citotóxicos).

El principio del tratamiento que involucra la administración de IL-2 es seguido de múltiples procedimientos de leucoforésis, las células mononucleares obtenidas de esta manera se incuban con IL-2 para la generación de células LAK , las cuales son transferidas a los pacientes con subsecuentes dosis de IL-2, este tratamiento es actualmente utilizado en pacientes con diversas clases de tumores.

Dado que la inmunoterapia adoptiva con IL-2 y células LAK ha sido ampliamente discutida, en parte porque es todavía muy incipiente, dado que requiere más investigación, y en parte también por la toxicidad inherente mostrada en los estudios de fase uno (fiebre, retención hídrica, hipotensión, daños neurológicos, entre otros) que parece ser dosis dependiente, y su farmacocinética (vida media inferior a 6 minutos), en la actualidad es necesario desarrollar

algunas perspectivas con la finalidad de obtener mayor seguridad y efectividad en esta terapia.

Las perspectivas son las siguientes:

- A).- Asociar los tratamientos convencionales con la inmunoterapia adoptiva.
- B).- Administrar diferentes combinaciones de inmunomoduladores.
- C).- Investigar otras formas de administración, por ejemplo, vías diferentes, dosis menores e infusiones constantes.
- D).- Desarrollar vehículos especializados que incrementen su potencial inmunoterapéutico, disminuyendo la toxicidad, por ejemplo, los liposomas.
- E).- Asociar diferentes fármacos con inmunoterapia para disminuir toxicidad.

INTRODUCCION

Durante los últimos años se han hecho progresos considerables en el desarrollo de técnicas específicas para el tratamiento del cáncer. Las tres modalidades utilizadas con este fin son : cirugía, radioterapia y quimioterapia. En los últimos cinco años se han desarrollado nuevas técnicas para minimizar los tumores y a menudo se utiliza un tratamiento combinado de radioterapia y quimioterapia, que muestra ser más efectivo. Estas dos modalidades son usadas más frecuentemente en el tratamiento del cáncer local y regional.

La quimioterapia continua su desarrollo con nuevas drogas y nuevas combinaciones de éstas, pero se ha descubierto que la administración sistemática de agentes quimioterapéuticos frecuentemente expone a las células normales a cambios estructurales y funcionales. Se ha descubierto que muchos de estos químicos son altamente citolíticos y producen alta toxicidad en los tejidos, pese a ello, en muchos casos las células cancerosas resisten el tratamiento. Así, el cáncer continua siendo un problema, el cual requiere un tratamiento con mayor efectividad.

En base a ello, en los últimos años se ha analizado el papel del sistema inmune en la defensa contra el cáncer. Una de las razones de este hecho son los avances tecnológicos aplicados a la inmunología y la biología molecular, teniendo como finalidad facilitar la identificación, aislamiento y producción de sustancias que tienen la capacidad de incrementar la respuesta inmune al tumor. Estas sustancias se han denominado genéricamente como : “Modificadores de la respuesta biológica”.

La base científica es ahora lo suficientemente firme para el establecimiento de esta modalidad; el uso de inmunomoduladores tiene los suficientes fundamentos basados en evidencias experimentales que produjeron la alteración del sistema inmune, mostrándose un tratamiento efectivo contra el cáncer en modelos animales.

Entre los modificadores de la respuesta biológica se encuentra la IL-2, que se distingue por su capacidad de generar una clase de linfocitos asesinos activados (células LAK). El interés reciente en el potencial de células LAK en el tratamiento de cáncer es respaldado por numerosas investigaciones que demuestran que dichas células pueden provocar una regresión directa , y ocasionalmente una remisión completa de los tumores , como en el caso de melanomas y cáncer renal. La asociación con otras citoquinas y nuevos protocolos de quimioterapia incrementan sus posibilidades terapéuticas.

Durante la última década los avances en inmunoterapia han sido acrecentados por ingeniería genética y cultivo de células, además de la improvisación de técnicas de secuenciación de proteínas y ácidos nucleicos. Esto hace posible la obtención de moléculas sumamente puras entre las que se encuentran además de las interleucinas, interferones, factor de necrosis tumoral y factor de crecimiento hematopoyético, los cuales poseen funciones inmunomoduladoras.

Una de las alternativas para mejorar la efectividad terapéutica de la IL-2, así como de otros inmunomoduladores, son los liposomas, dado que estos agentes incorporados en ellos, son atrapados en forma pasiva y natural por las células y los órganos del sistema retículo endotelial, los blancos precisos de una sustancia con propiedades inmunoestimulantes.

Los liposomas actualmente son considerados como los vehículos que pueden cambiar radicalmente, a futuro no muy lejano, las formas de tratamiento del cáncer.

ANTECEDENTES

1.- MECANISMOS DE INMUNIDAD CONTRA TUMORES

Los tumores malignos o cánceres crecen de una manera incontrolada invadiendo tejidos normales y con frecuencia metastatizan y crecen en sitios distantes del tejido de origen. En general los cánceres se derivan de una o pocas células normales que sufren un proceso poco conocido llamado “ transformación maligna “ . Los cánceres pueden originarse de la mayoría de los tejidos en el cuerpo. Estos se derivan a partir de las células epiteliales, llamadas carcinomas, y son el tipo más común de cáncer. Los sarcomas, son tumores malignos de tejidos mesenquimáticos, originados de células como fibroblastos, células musculares y células adiposas. Los tumores malignos sólidos de tejidos linfoides son llamados linfomas; tumores malignos de médula y tejido sanguíneo, de linfocitos y otras células hematopoyéticas son llamadas leucemias (20).

Una función mayor o principal del sistema inmune puede ser la de reconocer y destruir células malignas transformadas liberadas, llamadas “clonas mutantes”, antes que ellas crezcan en tumores. Esta idea llamada “inmunovigilancia” fué articulada por Macfarlane, Burnet y Lewis Thomas en los 50's y 60's. Si la célula maligna y los tumores pueden estimular la respuesta inmune es posible que ellos puedan expresar antígenos tumorales que son reconocidos como extraños por el hospedero . Además si el concepto de inmunovigilancia es válido los efectores celulares inmunes, como son las células B, células T cooperadoras, linfocitos T citotóxicos o células NK pueden ser capaces de reconocer antígenos tumorales y mediar la muerte de células tumorales (28).

Una indicación histopatológica de que los tumores estimulan la respuesta inmune es la proliferación linfocitaria (hiperplasia) en sitios de drenado de nódulos linfáticos del tumor en crecimiento. Además, hay con frecuencia evidencia de los efectos de las citoquinas en tumores, como es la expresión de MHC clase II en células tumorales y células endoteliales de los vasos sanguíneos, sugiriendo una respuesta inmune activa en los sitios del tumor.

La expresión de proteínas de MHC en células tumorales puede ser crítica para el reconocimiento y destrucción de las mismas ya que las células T pueden reconocer antígenos únicamente en asociación con moléculas de MHC. Además se ha observado que los tumores que estimulan la respuesta inmune expresan cantidades adecuadas de moléculas de MHC, mientras que otros tumores no inmunogénicos no expresan suficientes moléculas de MHC (77).

Los antígenos tumorales provocan la activación de la respuesta inmune humoral y celular *in vivo* y muchos mecanismos efectores inmunoreguladores son capaces de matar células tumorales *in vitro*. El tumor produce en el huésped aumento de anticuerpos específicos para los antígenos tumorales. Los antígenos que provocan la respuesta inmune se cree que están limitados a proteínas que no son expresadas en tejidos normales; no existe evidencia, sin embargo, de que la respuesta inmune humoral pueda inhibir el desarrollo normal del tumor o su crecimiento.

Las células T citotóxicas (CTLs) provocan actividad efectiva antitumoral *in vivo*, como se demuestra en estudios experimentales de tumores transplantados. En este caso los efectores celulares son predominantemente los de MHC de clase I.

Las células NK, pueden ser efectores celulares de la respuesta inmune adquirida o natural contra tumores ya que utilizan el mismo mecanismo lítico de las CTLs para matar células. sin embargo, no expresan receptores de antígeno de células T, y matan a las células blanco en una manera no restringida por MHC. Es posible que las células NK jueguen un papel de inmunovigilancia contra tumores en desarrollo, especialmente si estos expresan antígenos virales. (77).

Los macrófagos son potencialmente importantes como mediadores celulares de la actividad antitumoral. Como las células NK, los macrófagos expresan receptores para FC gamma y pueden actuar contra células tumorales cubiertas con anticuerpo. Hay varios mecanismos por los cuales los macrófagos aniquilan a las células tumorales, algunos de los cuales son

esencialmente los mismos que utilizan en las infecciones por microorganismos. Esto incluye la liberación de enzimas lisosomales y metabolitos de oxígeno reactivo. Los macrófagos activados también expresan la citoquina TNF, la cual tiene actividad contra las células tumorales. (1).

Durante la última década ha resurgido el interés por afrontar el tratamiento y prevención del cáncer desde el punto de vista inmunológico, es decir, el estudio de los mecanismos de defensa del organismo que participan de manera importante en el control de las neoplasias, así como la investigación de diferentes sustancias con capacidad inmunoterapéutica a las que se les ha denominado “Inmunomoduladores” o en una forma más general, como “Modificadores de la respuesta biológica”. El impulso que han tomado estas alternativas ha sido además motivado por la falta de actividad antitumoral específica de la quimioterapia y radioterapia. (20,51). Las bases científicas están muy firmes para poder establecer una cuarta modalidad de tratamiento, el uso de modificadores de la respuesta biológica.

Actualmente las estrategias para el tratamiento inmunoterapéutico del cáncer se dividen en :

1).- Inmunoterapia activa :

a).- Específica

b).- No específica

2).- Inmunoterapia pasiva.

La inmunoterapia activa se refiere a la inmunización del huésped que presenta el tumor, con agentes capaces de generar una respuesta inmunológica que elimine o retarde el crecimiento del mismo, y puede realizarse en forma específica cuando la inmunización se practica con células tumorales completas, muertas por radiación o modificadas por agentes químicos o con extractos antigénicos purificados específicos del tumor.

La inmunoterapia activa de forma inespecífica, se realiza cuando se administran agentes estimuladores de los mecanismos de inmunidad en general, estimulando en forma concomitante una respuesta específica contra el tumor ; la mayoría de estos agentes son de

origen microbiano, por ejemplo, el BCG, lipopolisacárido, MDP, proteínas bacterianas de membrana externa, polisacáridos entre otros (51).

La inmunoterapia pasiva involucra la transferencia al huésped portador del tumor de anticuerpos o células linfoides sensibilizadas contra el tumor, con la capacidad de mediar una respuesta antitumoral específica. De este principio se deriva una de las modalidades más recientes para el tratamiento del cáncer denominada “Inmunoterapia adoptiva” la cual consiste en la transferencia al huésped de linfocitos asesinos activados (LAK) por IL-2 y macrófagos citotóxicos activados por INF γ (45).

Desde sus inicios se comprendía el alto potencial que representaba la transferencia de células específicas a un tumor dado, pero no había recibido la atención para su utilización en humanos, porque se presentaban dificultades teóricas y prácticas asociadas a este tipo de inmunoterapia. La falta de entendimiento del origen y comportamiento a nivel celular y molecular del cáncer, y la falta de comprensión de las bases inmunológicas de la respuesta antitumoral restringió el avance de esta área, así como la limitación para clonar y expandir grandes cantidades de “biomoduladores” específicos del tumor; en la actualidad estos obstáculos han sido superados casi en su totalidad gracias a conocimientos técnicos como DNA recombinante. (74).

Odham describió que los modificadores de la respuesta biológica son agentes con mecanismos de acción similares a las respuestas biológicas propias del huésped y pueden actuar de las siguientes maneras:

1).- Incrementando la respuesta antitumoral del huésped con un aumento directo y/o restauración del mecanismo efector o mediador de la respuesta y/o la disminución del componente de la reacción del huésped que puede ser deteriorada.

2).- Incrementando la respuesta del huésped en biológicos naturales o derivados sintéticos, como efectores o mediadores de la respuesta antitumoral.

3).- Aumentando las respuestas del huésped con células tumorales modificadas o vacunas, que pueden estimular grandemente la respuesta con un incremento de la sensibilidad a células tumorales de una respuesta ya existente.

4).- Disminuyendo la transformación y/o incrementando la diferenciación de células tumorales.

5).- Incrementando la capacidad del huésped para tolerar el daño por citotoxicidad a diferentes modalidades del tratamiento del cáncer.

Muchas de las utilidades descritas involucran el aumento de la respuesta del huésped (51).

II.--PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA INTERLEUCINA-2.

La IL-2 es un mediador fundamental en la activación de la respuesta inmunitaria, capaz de modularla, por lo que se le considera como la “ inmunohormona del sistema inmune (53).

La IL-2 fue llamada originalmente “factor de crecimiento de células T (TCGF)”, siendo la principal citoquina responsable de la progresión de linfocitos T de la fase G1 a la S del ciclo celular. Es producido por células T CD4+ y en menor cantidad por células T CD8+ . La IL-2 actúa en las mismas células que la producen, por lo tanto, funciona como un factor de crecimiento autócrino. La IL-2 también actúa en linfocitos T periféricos, incluyendo a células CD4+ y CD8+, y es por lo tanto un factor de crecimiento parácrino. Durante la respuesta inmune, la IL-2 no circula en sangre, sino que actúa a distancia , por lo tanto, no puede ser considerado como un factor de crecimiento endocrino. La IL-2 es una proteína de 14-17 KD codificada por un solo gen en el cromosoma 4 humano.(7).

La heterogeneidad en el tamaño de la proteína madura es debida a los sitios de glicosilación variables en el polipéptido de aproximadamente 130 aa. Normalmente, la IL-2 es transcrita, sintetizada y secretada por células T únicamente bajo la activación de antígenos. La síntesis de la misma es usualmente transitoria con un pico de secreción que ocurre después de su activación. (1).

En humanos, la IL-2 se empezó a aplicar en 1982 a partir de una purificación parcial del cultivo de linfocitos humanos normales estimulados, y posteriormente del material de un tumor humano de células T, el cual permitió el tratamiento de pacientes con mg. de IL-2 pura en 1983. Los ensayos clínicos con la IL-2 recombinante comenzaron en 1984. En la actualidad se le busca actividad terapéutica en más de 3000 pacientes con carcinomas y sarcomas metastásicos, los cuales han sido tratados con esta terapia con resultados bastante prometedores, ya que la mayoría de estos pacientes no respondieron a ninguna de las formas de terapia convencionales y se encontraban en un estado avanzado de la enfermedad. (55,57).

III.- USO DE LA INTERLEUCINA-2 EN INMUNOTERAPIA DE CANCER

EXPERIMENTAL.

Lafreniere y col. estudiaron métodos para la expansión de células LAK en inmunoterapia, generadas en cultivos con IL-2 recombinante (rIL-2) por 3,5 y 7 días, no encontrando diferencias significativas en el número de células obtenidas, su toxicidad *in vivo* o su efectividad terapéutica (39).

Iigo y col. utilizaron transplantes experimentales de tumores murinos para evaluar la potenciación de la actividad antitumor, con una combinación de rHu-IL-2 e INF γ utilizando un adenocarcinoma 755 vía s.c., encontrando que la combinación de terapias puede funcionar sinérgicamente en los variados sistemas murinos, dando evidencia de su potencial clínico. (29).

Ballas y col. observaron la generación de células LAK en cultivos a partir de timocitos murinos, encontrando que estos fueron capaces de generar LAK con dosis relativamente grandes de IL-2 (500-1000 U/ml.) (11).

Thoshitani y col. investigaron la transferencia adoptiva de células LAK, que pueden mostrar eficiente actividad antitumoral sin dañar a las células normales del huésped. Encontraron que las células LAK alogénicas y singénicas fueron igualmente activas *in vivo*, y que el uso de células LAK alogénicas es un método efectivo en inmunoterapia (77).

Chong y col. encontraron una metodología que ayuda a la identificación y caracterización de las moléculas de superficie de las células tumorales reconocidas por las células LAK, observando que cada célula LAK puede ser poliespecífica, o que reconozca un marcador común en muchos tumores (16).

Rodolfo y col. utilizaron adenocarcinoma C26 en ratones BALB/c para evaluar altas y bajas dosis de rIL-2 con y sin células LAK o linfocitos inmunes a tumor por vía s.c. , encontrando que a bajas dosis de rIL-2 obtienen mayor sobrevivencia, y que los linfocitos inmunes a tumor son más efectivos que las células LAK cuando se combinan con rIL-2 (61).

Ho y col. evaluaron los efectos de la administración exógena de rHu-IL-2 en tumores de ratones de diferentes edades, encontrando que la función de las células asesinas naturales fué menor en ratones viejos, y que la IL-2 incrementó la sobrevivencia en todos los ratones, demostrándose que el éxito del resultado no tiene relación con la edad (26).

Rodolfo y col. utilizaron un adenocarcinoma murino C26 en ratones BALB/c para evaluar el potencial terapéutico del tratamiento con rIL-2 a dosis altas y bajas con o sin células LAK , o linfocitos inmunes específicos a células de tumor. Los resultados indican que los linfocitos son más efectivos que las células LAK cuando se da una combinación con rIL-2 y tratamiento adyuvante (63).

Iigo y col. observaron en el caso de adenocarcinoma 755 la actividad antitumoral de la rHu-IL-1 α , el rHu-TNF y el rINF- β fué incrementada con la administración concomitante de rHu-IL-2 (28).

Marincola y col. demostraron que la inmunoterapia adoptiva con células LAK humanas y rHu-IL-2 es más efectiva contra el crecimiento del cáncer pancreático en ratones. Este efecto es independiente de la actividad antitumoral de la IL-2 administrada sola (45).

Cesario y col. observaron los efectos de la administración de dosis altas de IL-2 en ratas normales, concluyendo que dichas dosis resultan significativamente dañinas a nivel funcional, bioquímico e histológico (14).

Bergers y col. estudiaron la incorporación de la IL-2 en liposomas, midiendo después la eficacia de incorporación, la cual fué dependiente de la carga del liposoma, el pH y la fuerza iónica del medio. Los liposomas con carga negativa resultaron ser los de mayor efectividad (12).

Connor estudió el uso de IL-2 e INF- γ para el tratamiento de cáncer. Se introdujeron los genes de ambos inmunomoduladores en células MTB-2, encontrándose una disminución de la capacidad formadora de tumores en las células utilizadas. Se logró un 60% de la regresión del tumor en los animales tratados (17).

Uchiyama y col. determinaron que la transfección del gene de IL-2 en células de melanoma incrementa la respuesta de los linfocitos de sangre periférica en los pacientes con melanoma, lo que indica que la técnica es una estrategia importante en el incremento de la respuesta inmune inducida por vacunas de extractos celulares (78).

Sznol y col. trabajaron con IL-2 en relación a la implementación de dosis, aplicaciones y sus posibles combinaciones con otros agentes biológicos y quimioterapia, en pacientes con

carcinoma renal metastásico, llegando a la conclusión de que dosis altas de IL-2 pueden ser un potente agente anticancerígeno (74).

Nakajima y col. probaron células NK activadas junto con IL-2 en pacientes con cáncer, así como también anticuerpos monoclonales Anti-CD3, encontrando que una combinación de éstos con la IL-2 es más efectivo que anticuerpos o IL-2 solos. Esta terapia es una alternativa de valor para el tratamiento de cáncer en humanos (49).

Deehan encontró que la rIL-2 administrada a pacientes con tumores sólidos induce un efecto benéfico limitado en un 20-30% de los pacientes. Los resultados se reportaron en base a los niveles de citocinas en suero antes y durante el tratamiento con IL-2 (19).

Vujanovic encontró que la subpoblación A-NK de células NK representa un grupo de células efectoras vs tumores sólidos, por lo que poseen un gran potencial terapéutico antitumoral (81).

Foa y col. demostraron como los genes de las citocinas pueden ser transducidos en el DNA de varios tumores experimentales llevando a un incremento en la tumorigenicidad de las células neoplásicas tratadas (21).

Anderson estudió los efectos de la formulación de rIL-2 utilizando diversas vías de administración. Los resultados se midieron en base a inmunoensayos enzimáticos, encontrándose que la ruta de administración es importante para determinar la concentración de droga adecuada y el efecto de citotoxicidad en las células tumorales estudiadas (6).

Yang y col. sugirieron el uso secuencial de Anti-CD3, IL-2 y TNF para la inducción de células LAK y el mantenimiento de una potencial actividad antitumoral como una nueva estrategia en la inmunoterapia combinada (84).

Rodolfo y col. activaron esplenocitos en cultivos de células de linfocitos tumorales en presencia de IL-2, para determinar que los linfocitos con potencial terapéutico pueden ser obtenidos de ratones con carcinoma de colon C26. La eficacia terapéutica de tales linfocitos fué buena cuando se compararon en una inmunoterapia adyuvante (62).

Luo y col. comprobaron que la terapia adoptiva utilizando células NK en lugar de células de bazo, en combinación con IL-2 exógena, puede mejorar la eficacia de la inmunoterapia en tumores (43).

Joffret y col. demostraron que los liposomas incrementan la proliferación dependiente de IL-2 de una línea de linfocitos T citotóxicos (CTL) usados para medir la actividad de IL-2. Los efectos se observaron mejor con dosis subóptimas de IL-2 y bajas concentraciones de lípidos (30)

CANCER DIAGNOSTICADO	NUMERO DE PACIENTES	REGRESION COMPLETA	REGRESION PARCIAL (MAXIMO 50%)	REGRESION COMPLETA O PARCIAL
Riñón	72	8	17	25 (35%)
Melanoma	48	4	6	10 (21%)
Colorectal	30	1	4	5 (17%)
Linfoma no-Hodgkin's	7	1	3	4 (57%)
Sarcoma	6	0	0	0
Pulmón	5	0	0	0
Mama	-	-	-	-
Otros	9	0	0	0
Total	177	14	30	44 (25%)

Tabla No. 1 Efectividad de tratamientos utilizando células LAK e IL-2 en cáncer humano

CANCER DIAGNOSTICADO	NUMERO DE PACIENTES	REGRESION COMPLETA	REGRESION PARCIAL (MAXIMO 50%)	REGRESION COMPLETA O PARCIAL
Rinón	54	4	8	12 (22%)
Melanoma	42	0	10	10 (24%)
Colorectal	12	0	0	0
Linfoma no Hodgkin's	11	0	0	0
Sarcoma	-	-	-	-
Pulmón	-	-	-	-
Mama	3	0	0	0
Otros	8	0	0	0
Total	130	4	18	22 (17%)

Tabla No. 2 Efectividad de tratamientos utilizando IL-2 en cáncer humano.

CANCER DIAGNOSTICADO	TRATAMIENTO	NUMERO DE PACIENTES	REGRESION COMPLETA	REGRESION PARCIAL (MAXIMO 50%)
Carcinoma Renal Metastásico	INF- α 2b IL-2	40	15	8
Carcinoma Renal Metastásico	IL-4 IL-2	17	3	5
Cáncer de Pulmón no Metastásico	IL-2 IL-3	22	4	-
Melanoma Metastásico	INF- α IL-2	283	9	14
Carcinoma Renal Metastásico	INF- α IL-2	20	3	4
Cáncer Colorectal	IL-2 IL-3	22	8	-
Carcinoma Renal Avanzado	INF- α IL-2	23	2	-
Carcinoma renal	IL-2 INF- γ	38	7	6
Melanoma Avanzado	IL-2 INF- γ	44	2	-

Tabla No. 3 Efectividad del tratamiento de cáncer humano utilizando IL-2 en combinación con otras citocinas

TIPO DE DAÑO	DOSIS	TIPO DE CANCER	REFERENCIA
Síndrome de escape capilar :extravasación de fluidos con hipotensión. Edema pulmonar y fallo multiorgánico	15×10^6 U/Kg	Carcinoma Renal y Melanomas	71
Fiebre, anorexia, vómito, anemia y trombocitopenia.	$1\mu\text{g} /\text{Kg}/\text{bw}/14$ días	Cáncer de Pulmón	40
Fiebre, escalofríos, vómito, diarreaa, dificultad para respirar, hipotensión, edema y prurito.	$2-6 \times 10^6$ UI/m2/día	Carcinoma Renal Metastásico y Melanoma	65
Hipotensión, nefrotoxicidad y fatiga	1.5×10^6 UI/día/4 semanas	Carcinoma Renal Metastásico	56
Infecciones del tracto urinario y tracto respiratorio, bacteremia e infecciones de la piel.	700000 U/Kg	Carcinoma Renal Metastásico	54
Fiebre, letargo, náusea y vómito.	100 mg/día	Cáncer de Pulmón	69
Vómito y náuseas	720000 UI/kg/c 8 hrs	Carcinoma Renal Metastásico	35
Prurito, hipotensión e incremento en peso.	720000 UI/Kg/c 8 hrs	Melanoma y Carcinoma Renal Metastásico	22
Disfunción respiratoria, arritmias, fibrilación atrial, taquicardia e hipotensión.	800000UI/kg	Maelanoma Metastásico y Carcinoma de Células Renales	82
Fiebre, fatiga, Hipotensión, náuseas, vomito y dolor de cabeza.	21.6×10^6 UI/día/2 semanas	Carcinoma renal Metastásico	55

Tabla No. 4 Efectos tóxicos de la IL-2 en tratamiento de cáncer humano

IV.- PROPIEDADES GENERALES DE LOS LIPOSOMAS

Por décadas, los biólogos celulares han estado interesados en las propiedades de las membranas celulares. Hace un cuarto de siglo que el estudio de las propiedades físicas de los componentes membranales condujo al descubrimiento de ciertas estructuras vesiculares cerradas formadas espontáneamente en dispersiones acuosas de lípidos. Este hecho fue encontrado accidentalmente en 1961 por Alec D. Bangham mientras evaluaba el papel de los fosfolípidos en la coagulación sanguínea, denominando a su creación liposomas. Estas vesículas artificiales de fosfolípidos presentan todas las propiedades físicas y químicas de las membranas celulares. lo que permitió en un principio utilizarlos en modelos *in vitro* de membranas biológicas en la investigación básica en bioquímica de membranas y mecanismos de transporte.

Por mucho tiempo, éste fue el uso exclusivo que se les dio a los liposomas sin embargo, desde hace ya varios años los liposomas se han venido utilizando como un medio potencial para introducir deliberadamente materiales en el comportamiento intracelular. Así los liposomas surgieron como una nueva vía para introducir sustancias al interior de las células, lo cual llamó la atención a los biólogos celulares, moleculares, farmacólogos, inmunólogos y en general a todos los investigadores en biomedicina (6). De acuerdo con la definición proporcionada por la Academia de Ciencias de Nueva York, los liposomas son vesículas artificiales microscópicas compuestas de uno o más fosfolípidos, de tres clases diferentes: los de vesículas multilamelares grandes (VMG) que tienen un tamaño promedio de 80 nanómetros hasta 100 micras, de vesículas unilamelares pequeñas (VUP) con un tamaño promedio de 20 a 50 nanómetros de diámetro y de vesículas unilamelares grandes (VUG) con un tamaño promedio de 60 a 100 nanómetros. (31). (FIGURA No. 1).

Los liposomas de VMG se forman espontáneamente cuando los lípidos apropiados son hidratados, tienen un volumen de captura de 4 μ l en promedio por el contrario los de VUP

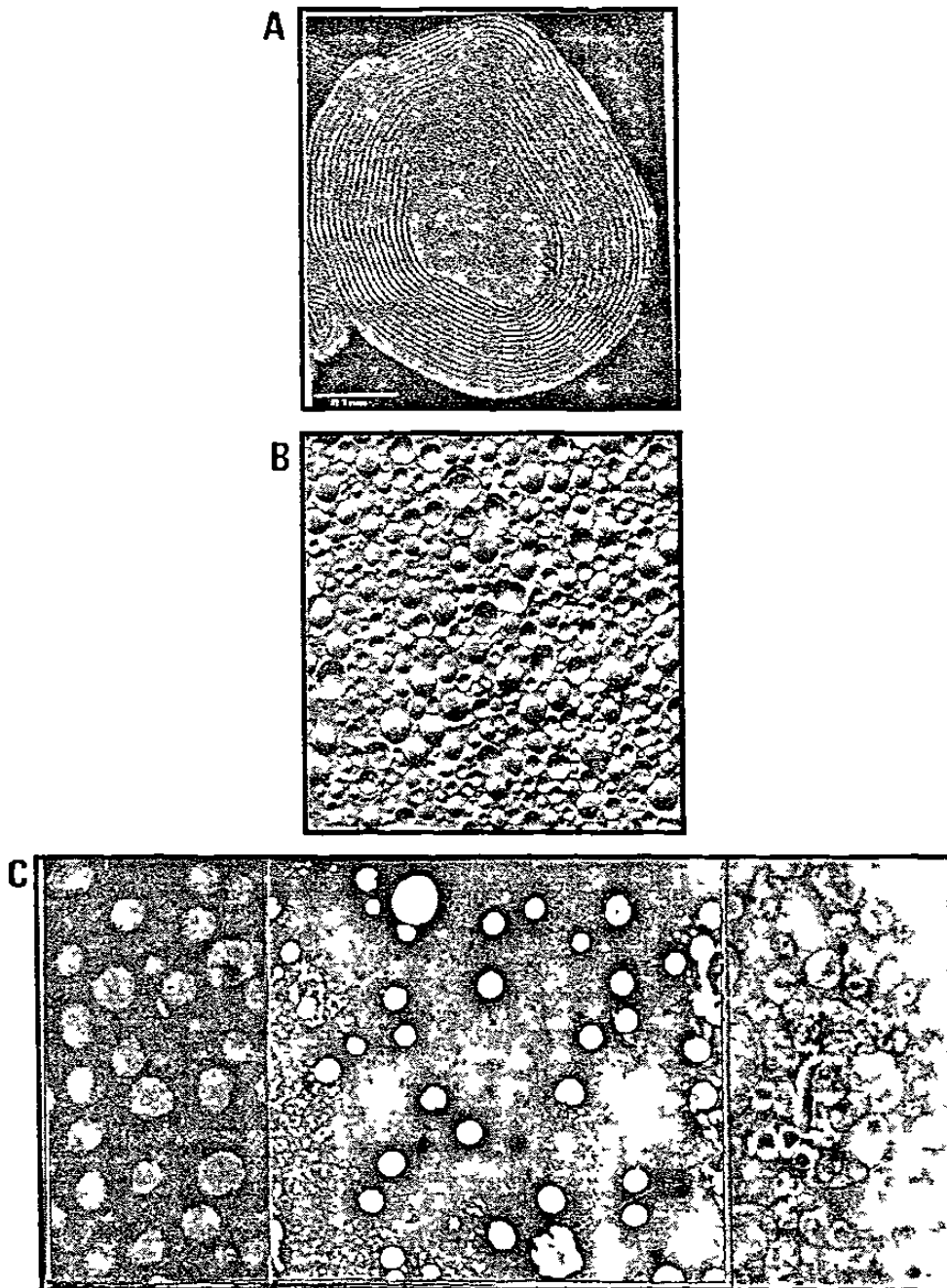


Figura No. 1 Estructura general de los liposomas. (A) Vesiculas Multilamelares Grandes. (B) Vesiculas Unilamelares Pequeñas. (C) Vesiculas Unilamelares Grandes.

atrapan poco volumen por mg. de lípido, dado que su volumen de captura promedio es de 0.5 μ l. y finalmente los de VUG que presentan un volumen de captura de 11 μ l por mg. de lípido en promedio.(32).

La eficiencia de encapsulación para la VMG es de 10%, mientras que para las VUP y VUG es de 1 y 40 % respectivamente. Los lípidos que son utilizados para formar a los liposomas tienen dos cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas y un grupo hidrofílico principal, características que les otorgan en términos físicos y geométricos un estricto balance entre las cadenas y los grupos principales, para que las moléculas puedan empaquetarse de un lado a otro como cilindros para formar estructuras planas y alargadas.

Los lípidos de algunos detergentes tienden a generar estructuras que se curvan sobre si mismas , llamadas micelas, mientras en los lípidos en los cuales las cadenas hidrocarbonadas predominan, no pueden hidratarse completamente o se curvan en dirección opuesta para formar micelas invertidas. (68).

Los fosfolípidos más comunes formadores de bicapas son fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina. Algunos lípidos cargados o colesterol pueden ser adicionados a la bicapa con la finalidad de cambiar las propiedades de superficie o de estabilizar la bicapa contra el ataque de algunos componentes del suero . (TABLA No. 6).(23,31).

La designación de la clase de lípido especifica el grupo principal, pero no la longitud o el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada. Las cadenas normalmente están formadas de 10-24 átomos de carbono y son completamente saturadas , o tienen un doble enlace en posición de 9-10. Para cada tipo de fosfolípido existe una temperatura de transición en la cual las cadenas cambian temporalmente de un estado bien ordenado parecido al sólido, a uno mucho más fluido, éste es el punto en el que las bicapas de lípidos se derriten en el mismo sentido como lo hace el hielo. La temperatura de transición para las cadenas insaturadas es generalmente menor de los cero grados centígrados y para las

cadenas completamente saturadas de 14-16 carbonos es de cerca de la temperatura fisiológica. La temperatura de transición de algunos fosfolípidos ha sido aprovechada en la construcción de liposomas sensibles a la temperatura para transportar drogas citotóxicas a tumores sólidos con hipertemia localizada.(23).

Los liposomas constituyen uno de los mejores sistemas acarreadores de moléculas en biomedicina (TABLA No. 5) dadas sus características , entre las que se encuentran: fácilmente metabolizables *in vivo* , son no tóxicos ni antigénicos, las moléculas son atrapadas sin unión química, los lípidos con carga positiva o negativa pueden ser utilizados para la construcción de liposomas con distintas propiedades de incorporación, estabilidad e interacción con las células, el tamaño del liposoma influye también en la estabilidad, incorporación de la droga, y la distribución *in vivo*. El procedimiento de esterilización, el patrón de distribución y la absorción de la droga dependen totalmente de las propiedades fisicoquímicas del liposoma y no de la droga, las cuales son más fáciles de manipular que la droga misma.(31).

MACRO MOLECULAS	CELULAS	SISTEMAS NO BIODEGRADABLES	SISTEMAS BIODEGRADABLES
❖ INMUNOGLOBULINA ❖ GLICOPROTEINAS ❖ FIBRINOGENO ❖ POLILISINA ❖ HORMONAS ❖ LECITINA ❖ ALBUMINA ❖ INULINA ❖ DEXTRAN ❖ DNA	❖ ERITROCITOS ❖ LEUCOCITOS ❖ HEPATOCITOS	❖ METACRILATO ❖ POLICRILATO ❖ POLIETILCELULOSA ❖ POLIACROLEINA ❖ NYLON ❖ CUENTAS DE SILICE ❖ LIQ. SURFACTANTES	❖ LIPOSOMAS ❖ NIOSOMAS ❖ UFASOMAS ❖ EMULSIONES ❖ MICELAS ❖ MIC. DE AC LACTICO Y GLICOLICO ❖ MIC. DE ALBUMINA ❖ ESF. DE CARBOHIDRATOS ❖ POLIORTOESTEROLES

Tabla No. 5 Sistemas acarreadores de drogas en biomedicina.

-
- SON METABOLIZABLES
 - FACILIDAD DE PREPARACION
 - SON NO TOXICOS Y NO ANTIGENICOS
 - LAS MOLECULAS SON ATRAPADAS SIN UNION QUIMICA
 - LAS MOLECULAS SENSIBLES SON PROTEGIDAS DE LA DEGRADACION O INACTIVACION
 - DEBIDO A SU PERMEABILIDAD, CONSTITUYEN UN SISTEMA DE LIBERACION DE MOLECULAS DEPENDIENTE DEL TIEMPO
 - AUMENTAN LA INCORPORACION DE MOLECULAS AL CITOPLASMA
 - EL PATRON DE DISTRIBUCION EN EL ORGANISMO PUEDE SER CONTROLADO POR LA CLASE DE LIPIDOS, TAMAÑO, CARGA. PERMEABILIDAD Y LIGANDOS ACOPLADOS A LA SUPERFICIE DE LAS VESICULAS
 - PUEDEN TRANSPORTAR UN AMPLIO RANGO DE MOLECULAS TANTO LIPOSOLUBLES COMO HIDROSOLUBLES
-

Tabla No. 6 Propiedades generales de los liposomas.

Los liposomas pueden interactuar con la célula de distintas maneras. La adsorción puede ser inespecífica o mediada por ligandos específicos tales como anticuerpos , hormonas, lectinas y puede o no dar lugar secundariamente a la incorporación endocítica de los liposomas y su contenido al interior celular. El intercambio de lípidos es un proceso en el cual se transfieren lípidos entre la membrana celular y la monocapa exterior del liposoma, sin existir asociación íntima entre ambos. La endocitosis es una de las formas más importantes de interacción, los fagocitos incorporan liposomas muy significativamente, mientras que otras células no fagocíticas, también endocitan liposomas, aunque en mucha menor proporción .

La fusión de los liposomas con la membrana celular origina que cualquier lípido o proteína de éste sea insertada en la membrana, cuando las vesículas unilamelares se fusionan , su contenido es inyectado directamente en el citoplasma. mientras que cuando se fusionan las vesículas multilamelares , inyectan su contenido en el citoplasma secuestrado en unas pocas bicapas concéntricas de la vesícula original (FIGURA No.2). Debido a que muchas células exhiben diferentes grados de endocitosis y fusión , se han insertado proteínas en la cubierta de algunos virus en los liposomas , con la finalidad de mejorar la incorporación de este tipo de células. Cuando los liposomas son inyectados intravenosamente , interactúan inmediatamente con las lipoproteínas de alta densidad, las cuales remueven las moléculas de fosfolípidos de las bicapas ocasionando el rompimiento de los liposomas y la liberación de su contenido en la circulación general. Sin embargo, cuando los liposomas contienen colesterol o fosfolípidos saturados, presentan un comportamiento más estable *in vivo* , debido a que estos compuestos previenen la desestabilización en la membrana y por ende la liberación del contenido de los liposomas. (51).

El tiempo en que los liposomas se mantienen en circulación depende del tamaño, la carga, la composición y la cantidad total de lípidos administrada, por ejemplo, las vesículas pequeñas tienen una vida media más larga que las vesículas grandes, y los liposomas con

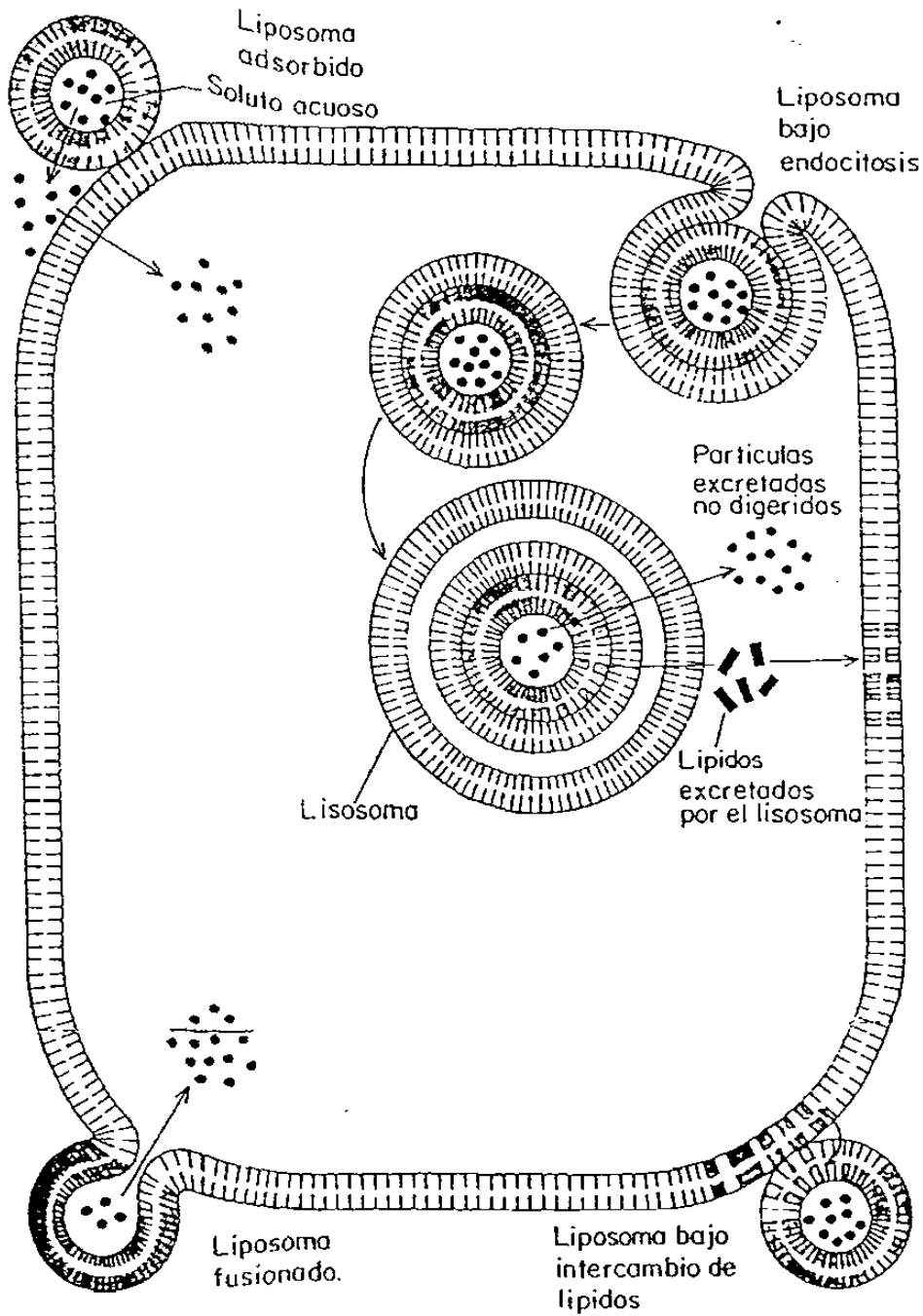


Figura No. 2 Mecanismos de interacción de los liposomas con las células.

carga positiva circulan por más tiempo que los liposomas con carga negativa. En circulación son incorporados por los monocitos, polimorfonucleares y células endoteliales, o interactúan con otros componentes de la sangre, así mismo, pueden ser removidos y retenidos por células fagocíticas del hígado, bazo, pulmón y médula ósea en la misma forma en que las otras partículas son removidas de la circulación. La cantidad de liposomas incorporada por estos órganos, es de alguna manera dependiente de la dosis de lípidos administrada, con dosis pequeñas, muchos liposomas son retenidos por el hígado, pero con dosis grandes la capacidad del hígado para remover partículas de la circulación es superada, y la cantidad que se mantiene en circulación incorporada en una mayor proporción por el bazo, pulmón y médula ósea; este fenómeno llamado “ bloqueo del sistema reticuloendotelial “ , el cual prolonga el tiempo de circulación de los liposomas, aunque no incrementa la acumulación a otros tejidos, porque produce un patrón de distribución muy similar.

En algunas circunstancias se ha demostrado que la encapsulación de un agente puede incrementar su distribución a sitios de isquemia y abscesos. La acumulación de los agentes liposomales en los sitios de isquemia crónica es debida probablemente a un aumento en la lisis de los liposomas por fosfolipasas presentes en el tejido necrótico; los mecanismos involucrados en la localización de los liposomas en abscesos infecciosos involucra a los polimorfonucleares y a los monocitos circulantes. Los liposomas inyectados en la cavidad peritoneal tienen una conducta semejante en la manera en que otras partículas son removidas de este sitio, una proporción de liposomas intactos alcanza los linfáticos y eventualmente llegan a circulación con la subsecuente distribución a los órganos del sistema reticuloendotelial. (8). Los liposomas inyectados subcutáneamente o intramuscularmente, son lentamente distribuidos del sitio de la inyección e incorporados al sistema linfático y solamente una pequeña cantidad alcanza la circulación, y eventualmente se distribuyen en hígado y bazo. Los liposomas también han sido administrados tópicamente, demostrándose que a través de esta ruta constituyen un sistema de liberación continua; así mismo los liposomas han tenido que ser administrados por otras vías, en las cuales se incluyen la vía oral, intraarticular y endolinfática entre otras (23).

Se han diseñado una gran variedad de métodos para la construcción de liposomas. Dos parámetros importantes que hay que considerar para la elección de uno de estos métodos, es el volumen capturado y la eficiencia de encapsulación, ambos están en función del tamaño y concentración de las vesículas. El volumen capturado es definido como el volumen atrapado por una cantidad dada de lípidos, y se representa por unidades de litro atrapados por mol de lípidos totales. La eficiencia de encapsulación es definida como la fracción del compartimento acuoso secuestrado por las bicapas de lípidos, esta medida es directamente proporcional a la concentración de lípidos, cuanto mayor cantidad de lípidos este presente, más soluto puede ser secuestrado en los liposomas. El método ideal es quizás aquel que produzca liposomas a partir de una gran variedad de componentes lipídicos, un amplio rango de concentraciones de lípidos, así como generar una población de vesículas con alto grado de homogeneidad. Finalmente el método debe requerir el mínimo de tiempo posible para evitar daño y contaminación de los lípidos, y la factibilidad de desarrollo a nivel masivo. Quizás no exista un método que reúna todas estas características, sin embargo, existen diversos métodos que pueden ser adaptables a las necesidades del trabajo. (TABLA No. 3) (31,73).

Los liposomas pueden ser utilizados de dos maneras diferentes:

- 1).- Para introducir agentes en las células que actúan contra residentes no deseables que pueden ser microorganismos o sustancias químicas.
- 2).- Para introducir agentes, los cuales activen la muerte de la célula u otras propiedades de la misma.

En ambos casos, se han obtenido aportaciones considerables en la utilización de los liposomas con el objeto de mejorar la eficiencia de los agentes antimicrobianos, quimioterapia antitumoral e inmunomoduladores. Su uso como tal en estas áreas representa una de las aplicaciones más fascinantes desde su descubrimiento.

V.- INMUNOMODULADORES ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS

Actualmente la inmunoterapia con una amplia variedad de agentes modificadores de alguna función biológica en motivo de una minuciosa evaluación en el campo clínico. Así, la inmunoterapia promete consolidarse como una opción con posibilidades de aumentar el tiempo de supervivencia de los pacientes con enfermedades caracterizadas por un fuerte compromiso inmunológico. (71).

Aunque la tecnología del DNA recombinante y los métodos de purificación actuales nos brindan la posibilidad de disponer en cantidades suficientes de las sustancias con capacidad de modular las funciones inmunológicas y a pesar del enorme potencial de la inmunoterapia en relación a su combinación con otras formas de tratamiento (quimioterapia, radioterapia y cirugía), pocos han sido los estudios encaminados a incrementar los efectos de los inmunomoduladores. Esto es explicable, porque la "era" de los inmunomoduladores apenas comienza y por el repentino salto que han dado desde su descubrimiento a su producción masiva y aplicación clínica.(40).

Una de las alternativas para mejorar la efectividad terapéutica de los inmunomoduladores, son los liposomas, dado que estos agentes atrapados en ellos, son tomados en forma pasiva y natural por las células y los órganos del sistema reticuloendotelial, los blancos precisos de una sustancia con propiedades inmunoestimulantes. Así, los liposomas pueden transportar a un inmunomodulador al lugar indicado donde es requerido para modular la respuesta inmune. La distribución a un sitio específico a través de un vehículo, es mucho más recomendado para aquellos inmunomoduladores que son capaces de estimular otras funciones fuera del sistema inmunológico, y que por tal motivo producen efectos secundarios indeseables. (65).

A la fecha solo algunos inmunomoduladores han sido encapsulados en liposomas (TABLA No. 4) y existe una preparación de liposomas conteniendo MTP (muramil tripéptido) en estudios de fase 1 para el tratamiento del cáncer humano, patentada por Ciba-Geigy.

En todos los casos se ha logrado demostrar que el inmunomodulador presente en los liposomas es mucho más potente que en su forma libre. El número de inmunomoduladores aumenta continuamente a medida que se van adquiriendo nuevos conocimientos sobre el sistema inmune, sus interacciones y sus mecanismos de regulación, además del estudio de nuevos agentes de origen microbiano y vegetal.; de tal manera que el potencial de manipularlos con la utilización de liposomas es muy amplio y especialmente prometedor.(74).

Los liposomas actualmente son considerados como los vehículos que pueden cambiar radicalmente en un futuro no muy lejano las formas de tratamiento de las enfermedades infecciosas y el cáncer. En los próximos años, la aceleración de los conocimientos y las técnicas utilizadas nos deparan con toda seguridad importantes descubrimientos en esta área de la biomedicina.(44).

VI.- IL-2 ATRAPADA EN LIPOSOMAS

Diferentes ensayos clínicos han confirmado que pautas de tratamiento a base de altas concentraciones de IL-2 pueden inducir la regresión de tumores resistentes a la terapia convencional. Los resultados mas favorables se han encontrado en el tratamiento de melanoma maligno metastásico y el carcinoma de células renales, donde son esperables alrededor de un 20 % de respuestas positivas, incluyendo algunas remisiones completas. A pesar de que los resultados obtenidos con IL-2 , en combinación o no con LAK/TIL son considerados como uno de los logros mas significativos de la inmunoterapia , existen serias limitaciones para la aplicación de este tratamiento. Una de las mas importantes es la grave toxicidad de la IL-2 que, además de ser un factor limitante de dosis, restringe su uso a enfermos terminales. Sobre el endotelio vascular se produce el llamado Síndrome de Escape Capilar : extravasación de fluidos con hipotensión, edema pulmonar y fallo multiorgánico (71). Dado que las manifestaciones más importante de toxicidad (fiebre, disfunción renal y hepática, edema, etc.) han sido asociadas con altas dosis y administración

prolongada de la IL-2 en humanos se ha demostrado que los liposomas pueden modificar la toxicidad por la alteración en la absorción y distribución de la droga atrapada. (41). Es por ello que actualmente se están valorando dosis y pautas de tratamiento menos tóxicas, como es el hecho de atrapar la molécula de IL-2 en diversos sistemas de liberación como PEG, microesferas de Metacrilato y Liposomas.

La asociación covalente de polietilenglicol (PEG) con rIL-2 resulta en una proteína bioactiva (PEG-IL-2) con una vida media prolongada, reducida reacción a los anticuerpos e incrementada eficacia antitumoral in vivo después de la administración intravenosa en modelos animales. Steerenberg y col. (68) han reportado un efectivo tratamiento locoregional en la línea 10 de cobayos portadores de un hepatocarcinoma, con inyecciones intratumorales de PEG-IL-2, encontrando que la administración de PEG-IL-2 fue menos inmunogénica que la rIL-2 en la línea de cobayos utilizada, demostrando también que la eficacia terapéutica de el tratamiento intratumoral de PEG-IL-2 se ve disminuida después de una terapia previa de rIL-2 o PEG-IL-2. (36,86,85).

Otras pruebas llevadas a cabo consistieron en comparar el efecto de la encapsulación de la IL-2 en liposomas pequeños, unilamelares, creando un sistema de liposomas tipo SSL-IL-2 y liposomas, así como la unión de la IL-2 al Polietilenglicol: PEG-IL-2, para determinar si se lograba un mayor efecto antitumoral que al utilizar la IL-2 libre. Kedar y col. (32) reportan que en estudios in vivo utilizando ratones de la cepa BALB/c con carcinoma metastásico avanzado, previamente tratados con quimioterapia el sistema SSL-IL-2 fue significativamente más efectivo que IL-2 libre, incrementando el número de linfocitos en bazo y sangre periférica, así como la actividad de las células LAK. Resultados similares se obtuvieron con PEG-IL-2, que también incrementa la sobrevivencia de los ratones 2 a 6 veces más que la IL-2 libre.

Con la finalidad de incrementar la eficacia terapéutica de la IL-2 recombinante se ha comenzado a utilizar en modelos experimentales el atrapamiento de dicha molécula en diferentes tipos de liposomas. El uso de los mismos ofrece diversas ventajas como la

protección de la citoquina atrapada de los efectos deteriorantes de las enzimas del plasma y anticuerpos *in vivo* , gran versatilidad en formulaciones liposomales, biocompatibilidad y factibilidad de producir las dosis permitidas por la industria farmacéutica. Recientemente los modificadores de la respuesta biológica y algunas citoquinas , particularmente la IL-2 se han sido empleados en animales y en tratamientos clínicos preliminares. (6).

Bergers y col. estudiaron la incorporación de la IL-2 en liposomas, midiendo después la eficacia de la incorporación, la cual fue dependiente de la carga del liposoma, el pH y la fuerza iónica del medio. Los liposomas con carga negativa resultaron los de mayor efectividad (12).

Konno y col. demostraron que la rHu-IL-2 atrapada en liposomas y aplicada en inyecciones peritumorales en ratones BALB/c inhibió significativamente el crecimiento de tumores sólidos y prolongaron el tiempo de supervivencia de los animales tratados. (37).

Kedar y col. (32) en un intento por incrementar la eficacia terapéutica de la IL-2 recombinante humana encapsularon dicha molécula en liposomas unilamelares grandes y pequeños, midiendo la actividad en sistemas *in vitro* e *in vivo* utilizando ratones de la cepa C57BL/6 , encontrando que la IL-2 atrapada en liposomas pequeños tiene una farmacocinética superior a la IL-2 libre o atrapada en liposomas grandes, con una ventaja de más del 85% de encapsulación de la IL-2 con actividad biológica, facilidad de preparación y una mayor estabilidad a 4 y 37 ° C .

La eficacia preclínica y terapéutica contra metástasis hepática y pulmonar en ratones de la IL-2 y liposomas ha sido reportada en el sarcoma murino MCA-106 y el adenocarcinoma de colon MC-38 por Loeffler y cols. (41) , quienes demostraron que este modelo de estudio con animales es apropiado para determinar aspectos de toxicidad de la IL-2, efectos histopatológicos, química del suero y valores clínicos hematológicos.

Estudios similares fueron llevados a cabo por Anderson y col. (5) incorporando IL-2 en liposomas multilamelares para modificar la biodistribución y prolongar la vida media de la citocina. Se utilizaron ratas para evaluar y caracterizar la toxicidad y los efectos patológicos de los liposomas-IL-2 administrados por vía i.v. contra IL-2 libre, encontrándose que al atrapar la IL-2 en liposomas se logra incrementar su potencia y disminuir la toxicidad pulmonar ocasionada por la utilización de la IL-2 libre.

Loeffler y col. (41) describen la eficacia antitumoral de el uso combinado de células LAK e IL-2 encapsulada en liposomas un modelo de metástasis hepática murina utilizando el adenocarcinoma de colon MCA-38. El resultado demuestra un efecto sinergista entre la IL-2 y las células LAK cuando la citocina es encapsulada en liposomas.

Recientemente Adler y col. (2) probaron el efecto de una vacuna utilizando liposomas alogénicos humanos contra melanoma, sola o en combinación con IL-2 en pacientes con melanoma metastásico. La vacuna fue preparada de fosfolípidos semisintéticos : dimiristol, fosfatidilcolina y dimiristol-fosfatidilglicerol, y membranas de 6 líneas celulares de melanoma humano. Se encontró una conversión de las respuestas de hipersensibilidad retardada a antígenos de melanoma en seis pacientes que mostraron mejoría clínica así como un aumento en la respuesta proliferativa a antígenos de melanoma y en la actividad citotóxica contra líneas de melanoma. El mayor porcentaje de respuestas favorables se observó en el grupo tratado con liposomas y dosis bajas de IL-2 aplicada localmente

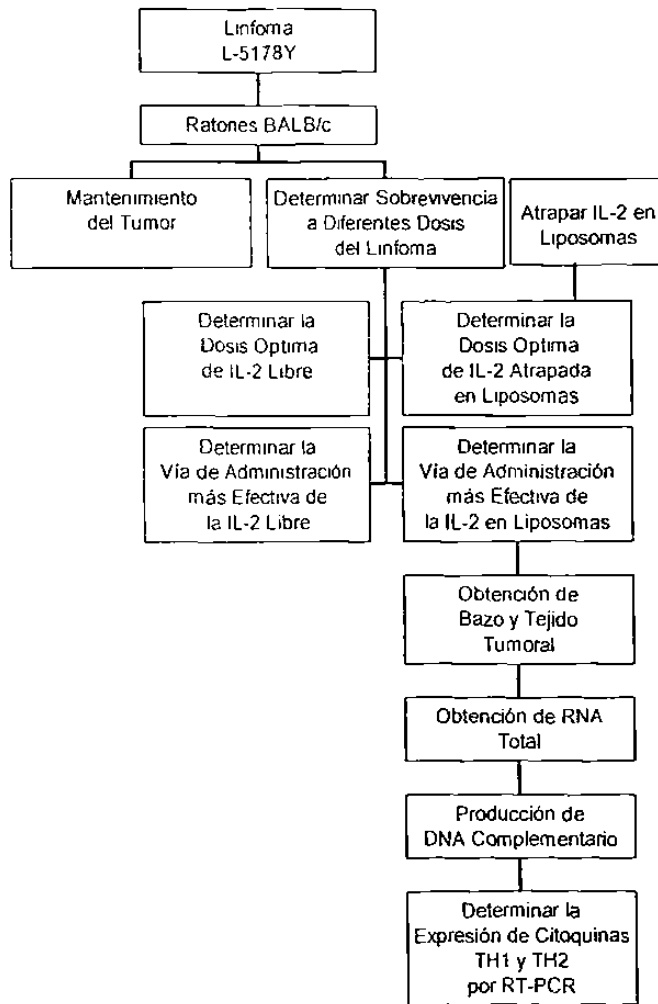
HIPOTESIS

La IL-2 recombinante atrapada en liposomas unilamelares puede inducir mayor efecto antitumoral que la IL-2 libre en ratones tratados con el linfoma subcutáneo L-5178Y.

OBJETIVOS

1. Desarrollar un método que aumente la eficacia en el atrapamiento de IL-2 recombinante en liposomas unilamelares.
2. Desarrollar un modelo experimental para evaluar la eficacia de estos inmunomoduladores.
3. Determinar el efecto antitumoral de la IL-2 recombinante libre y encapsulada en liposomas, contra el linfoma subcutáneo L-5178Y.
4. Determinar la expresión de citoquinas TH 1 y TH 2 en el tejido tumoral de animales tratados con IL-2 recombinante libre y atrapada en liposomas.

DIAGRAMA DE FLUJO



MATERIAL Y METODOS

LINEA CELULAR TUMORAL

La línea celular tumoral utilizada fue un linfoma subcutáneo denominado L-5178Y, el cual fue originalmente inducido con metilcolantreno en ratones DBA/2 (H-2d) y que se mantuvo en fase ascítica por trasplantes periódicos en ratones BALB/c (H-2d).

PROPAGACION DEL TUMOR

El linfoma se mantuvo en ratones de la cepa BALB/c, inoculando en forma intraperitoneal 2×10^6 células por ratón, resuspendidas en solución de PBS en un volumen total de 0.2 ml., obtenido por punción intraperitoneal de un ratón portador. El inóculo se realizó cada 15-18 días (25).

DETERMINACION DE LA SOBREVIVENCIA DE RATONES BALB/c A DIFERENTES DOSIS DE LINFOMA L-7158

Se sacrificó un ratón previamente inoculado con la línea celular del linfoma L-5178Y para extraer el paquete celular requerido, resuspendiendo las células en solución de PBS, centrifugándose a 2500 r.p.m. /10 min. Se lavaron las células nuevamente y se ajustaron con la misma solución, preparando 5 grupos de 10 ratones c/u que recibieron las siguientes dosis de células tumorales : 2×10^5 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 10×10^6 y 1×10^8 células /ratón. Se inóculo en un volumen total de 0.2 ml de solución de Hanks, vía s.c en la región dorsal del ratón, monitoreándose la sobrevivencia durante un período de 30-40 días.

DETERMINACION DE LA VIA DE ADMINISTRACION Y DOSIS OPTIMA DE IL-2 LIBRE EN LA REGRESION DEL TUMOR

El día nueve se administró IL-2 en dosis de 5000, 10000, 20000, 40000 y 80000 U , 5 grupos por vía i.v , en un volumen total de 0.2 ml. y 5 grupos por vía i.t. en un volumen total de 0.3 ml. Se monitoreó la sobrevivencia durante los siguientes 30 días. Cada dosis se administró a grupos de 10 ratones que fueron previamente inoculados con 2.5×10^6 células tumorales del linfoma (día 0), igualmente se preparó un grupo control el cual solamente se inoculó con las células tumorales. En todos los grupos se monitoreó la sobrevivencia durante un período de 30-40 días.

ATRAPAMIENTO DE INTERLEUCINA-2 RECOMBINANTE EN LIPOSOMAS

Se colocaron en un matr az 0.01g de colesterol, 0.03g de fosfatidilcolina y 0.01g de fosfatidiletanolamina, disolviéndose en 2 ml. de cloroformo, mezclándose en un v rtex por 30 seg. Utilizando un flujo continuo de N_2 se evapora el cloroformo hasta la producción de un film de fosfolípidos en la pared del matr az, enseguida se agrego 1 ml de IL-2, 1×10^6 U (250 μ g/ml) y 1 ml de PBS. Se agitó vigorosamente en un vortex por 5 minutos hasta disolver los fosfolípidos y formar vesículas multilamelares conteniendo la IL-2. Para producir vesículas unilamelares por el método de extrusión se utilizo un extruder (Lipix biomembranics, Vancouver Canadá) usando membranas de policarbonato con un poro de 100 nm de diámetro. Los liposomas son extruidos entre 5 y 10 veces a través de la membrana utilizando una presión de N_2 entre 200-500 mm de Hg. Una vez obtenidos se colocaron en viales en alicuotas de 1 ml y se congelaron a -20° C hasta su utilización, por un período no mayor de una semana después de su fabricación.

DETERMINACION DE LA VIA DE ADMINISTRACION Y DOSIS OPTIMA DE IL-2 ATRAPADA EN LIPOSOMAS EN LA REGRESION DEL TUMOR

Se inocularon 10 grupos de 10 ratones c/u con la dosis óptima de sobrevivencia al linfoma L-5178Y, (día 0) y un grupo control. El día nueve se inocularon los ratones con la IL-2 atrapada en liposomas en las siguientes dosis : 5000, 10000, 20000, 40000 y 80000 U, inoculándose vía i.v en un volumen total de 0.2 ml o vía i.t en un volumen de 0.3 ml. Se monitoreo la sobrevivencia durante los siguientes 30 días.

EXTRACCION DE RNA DE TEJIDO TUMORAL Y BAZO

Se llevó a cabo utilizando el reactivo de TRIZOL (Gibco BRL., Gaithersburg, M.D.). Esta técnica se desarrolló según como lo describe Chomeczynski (15). 100 mg de tejido fueron homogeneizados con 1 ml de TRIZOL y se incubaron posteriormente a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µl de cloroformo y se agitaron por 15 seg. se incubaron 2-3 min. y se centrifugaron a 12000 g/5 min. a 4° C , formándose una fase acuosa en la parte superior, una interfase y una fase orgánica en el fondo. El RNA se precipito a partir de la fase acuosa por la adición de 0.5 ml de isopropanol, se centrifugo a 12000g/5 min. a 4° C y se lavo el paquete con etanol al 70%. Se removió el etanol para solubilizar el RNA y se disolvió el paquete con agua tratada con DEPC. Para la integridad del RNA fue corrido en geles de Urea-Poliacrilamida.

PRODUCCION DE cDNA.

Se coloco en un tubo eppendorf 2 µg de RNA, 5 µl de solución amortiguadora RT (Transcriptasa Reversa), 1 µl de DTT (Dithiotreitol) 10 mM, 1 µl de inhibidor de RNAsas (RNAsin), 4 µl de dNTP (Deoxinucleótidos) 40 mM, 1 µl de oligo d (T) 165 mM, 200 U/µl de Superscript RT (Transcriptasa Reversa) y agua tratada con DEPC al 0.5% hasta obtener un volumen final de 30 µl. Se incubó la mezcla a 37° C por 90 min.; se congeló posteriormente hasta el momento de su uso.

METODO DE RT-PCR PARA DETECTAR LA EXPRESION DE CITOQUINAS TH1 (INF- γ , IL-2 E IL-12) Y TH2 (IL-4, IL-5 E IL-10) EN TEJIDO TUMORAL.

El método utilizado para determinar la expresión de citoquinas TH1 y TH2 en el tumor fue el descrito por Reiner y col. (35). Se colocó en un tubo 0.5 μ g de DNA, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 100 ng de cada primer, 10 mM de tris HCl , 59 mM de KCl, 0.01% de gelatina, pH 8.3 (a 37° C) y una U de Taq DNA polimerasa. Las condiciones para la reacción consisten en 94° C/1 min. , 50° C, 50° C y 72° C/30 seg. durante 30 ciclos. Los productos se analizaron en un gel de 20% de poliacrilamida y 8 M de urea, y se analizó por luz ultravioleta después de ser teñido con una solución de bromuro de etidio.

NOTA: Las secuencias de los primers utilizadas para cada citoquina fueron las siguientes:

IL-12 5' ATGGCCATGTGGGAGCTGGAG 3'
3' TTTGGTGCTTCACACTTCAGG 5'

IL-4 5' CATCGGCATTTTGAACGAGGTTC 3'
3' CTTATCGATGAATCCAGGCATCG 5'

RESULTADOS

EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DEL LINFOMA L-5178Y EN LA SOBREVIVENCIA DE RATONES BALB/c.

Para determinar la dosis óptima del linfoma L-5178Y en la supervivencia de los ratones, con el objeto de conocer la cantidad de células que ocasionan un porcentaje de mortalidad mayor al 90% en un lapso no mayor de 30 días se probaron las siguientes dosis del linfoma : 2×10^4 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 y 10×10^6 células /ratón. Se probaron cinco dosis diferentes de concentraciones celulares del linfoma L-5178Y encontrándose que dosis bajas de células, del orden de 2×10^4 células/ratón no causan efectos marcados en la tasa de mortalidad de los grupos de trabajo, ya que se registró un porcentaje de supervivencia de 90% a los 30 días posteriores a la inoculación del tumor, a diferencia de las dosis de 5×10^6 y 10×10^6 células/ratón que ocasionan un porcentaje de supervivencia de 50% y 25% respectivamente. (Figura No. 3). Las dosis con menor porcentaje de supervivencia fueron las de 1×10^6 con un 30% y la de 2.5×10^6 con un 10% a treinta días de inoculado el tumor.

EFECTO DE LA IL-2 INTRAVENOSA EN RATONES BALB/c CON LINFOMA L-5178Y. (DOSIS ALTAS).

Una vez determinada la dosis que origina un porcentaje mayor al 90% de mortalidad en un periodo de 30 días se probaron dosis altas de IL-2 inoculándose por vía intravenosa.(Figura No. 4). La dosis de 80000 U de IL-2 registró un porcentaje de supervivencia del 10%, 40000 U de IL-2 un 0% , menor que el 10% registrado por el grupo control y 20000 U de IL-2 un 30% de supervivencia.

EFFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE IL-2 INTRAVENOSA EN RATONES BALB/c CON LINFOMA L-5178Y.

La Figura No. 5 muestra los resultados obtenidos al probar dosis bajas como lo son 20000, 10000 y 5000 U de IL-2, con lo cual se registraron porcentajes del 70%, 40% y 60% respectivamente, mientras el control presenta un 40%.

EFFECTO DE 20000 U DE IL-2 LIBRE Y LIPOSOMAL VIA INTRAVENOSA EN RATONES BALB/c CON LINFOMA L-5178Y.

Habiendo encontrado las dosis que parecen tener la mejor efectividad en el incremento de las tasas de sobrevivencia se realizó un experimento utilizando 20000 U de IL-2 libre y liposomal, por vía intravenosa. (Figura No. 6). Con una dosis de 20000 U de IL-2 libre administrada por vía intravenosa se registró un 30% de sobrevivencia a los treinta días a diferencia del 40% observado con la aplicación de la misma dosis pero con la IL-2 atrapada en liposomas. El resultado del grupo control fue 0% de sobrevivencia.

EFFECTO DE 20000 U DE IL-2 LIBRE Y LIPOSOMAL VÍA INTRATUMORAL EN RATONES BALB/c CON LINFOMA L-5178Y.

Por vía intratumoral la misma dosis de 20000 U de IL-2 libre presenta un porcentaje de sobrevivencia del 60%, 40% arriba que el control. El mismo resultado se obtuvo al probar la misma dosis de IL-2 pero atrapada en liposomas. En este experimento el control registró un 20% de sobrevivencia al día treinta. (Figura No. 7).

Dados los resultados anteriores se decidió probar el efecto de 5000 U de IL-2 tanto libre como liposomal por ambas vías.

EFFECTO DE 5000 U DE IL-2 LIBRE Y LIPOSOMAL VÍA INTRAVENOSA EN RATONES BALB/c CON LINFOMA L-5178Y.

La Figura No. 8 nos muestra el resultado obtenido inoculando 5000 U de IL-2 libre por vía intravenosa, donde se registra un 30% de sobrevivencia, ; en cambio, cuando la interleucina

es atrapada en liposomas, por la misma vía incrementa a un 70% la sobrevivencia, 40% más respecto al control, que fue de un 20% al día treinta.

EFFECTO DE 5000 U DE IL-2 LIBRE Y LIPOSOMAL VÍA INTRATUMORAL EN RATONES BALB/c CON LINFOMA L-5178Y.

Finalmente se probó la vía alterna, es decir intratumoral con la misma dosis de 5000 U. Al inocular IL-2 en forma libre se registró un 40% de sobrevivencia, la mitad del 80% registrado al atrapar la IL-2 en liposomas. (Figura No. 9). El control registró solo un 20% de sobrevivencia.

MONITOREO DEL PESO DE RATONES BALB/c CON LINFOMA L-5178Y TRATADOS CON 5000 U DE IL-2 LIPOSOMAL VIA INTRATUMORAL.

Otro parámetro analizado fue el incremento en peso registrado en un lapso de 15 días después de la inoculación del tumor, en los ratones del grupo tratado con 5000 U de IL-2 por vía intratumoral debido a que fue el grupo de trabajo con mayor porcentaje de sobrevivencia de todos los analizados en un período de 15 días posteriores a la inoculación del tumor. (Figura No. 10). El incremento en peso es debido principalmente al crecimiento y expansión del tumor. Como puede observarse a partir del día 10 comienza a dispararse el incremento en peso de los ratones del grupo control a diferencia del grupo tratado con IL-2 que registran una ganancia en peso de 13.5 g a diferencia de 20.9 g de el grupo control. Se registra una diferencia de 7.4 g de diferencia en peso entre el control y el tratamiento.

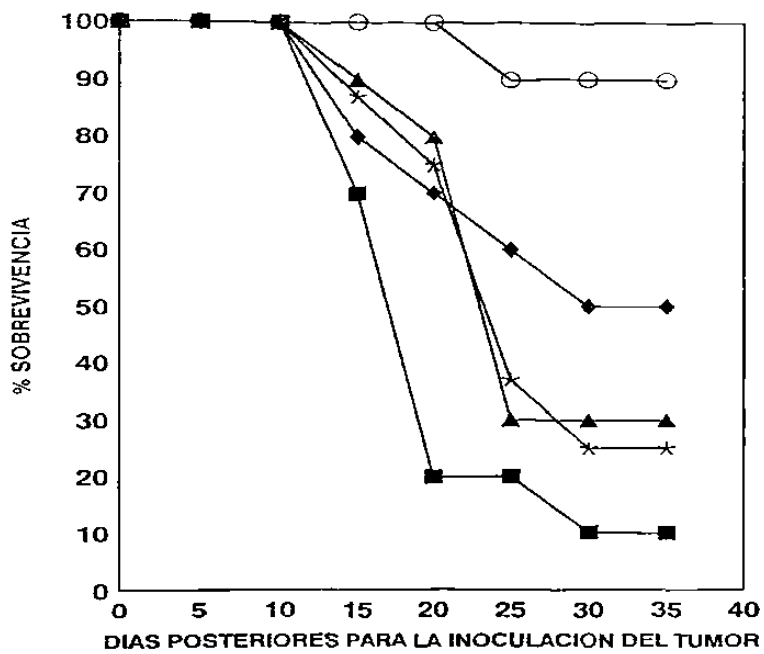


Figura No. 3 Efecto de diferentes dosis del linfoma L-5178Y en la supervivencia de ratones BALB/c. Se inocularon grupos de ratones con: 2×10^4 (○), 1×10^6 (▲), 2.5×10^6 (■), 5×10^6 (◆) y 10×10^6 (*) células/ratón, monitoreándose la supervivencia durante los siguientes cuarenta días.

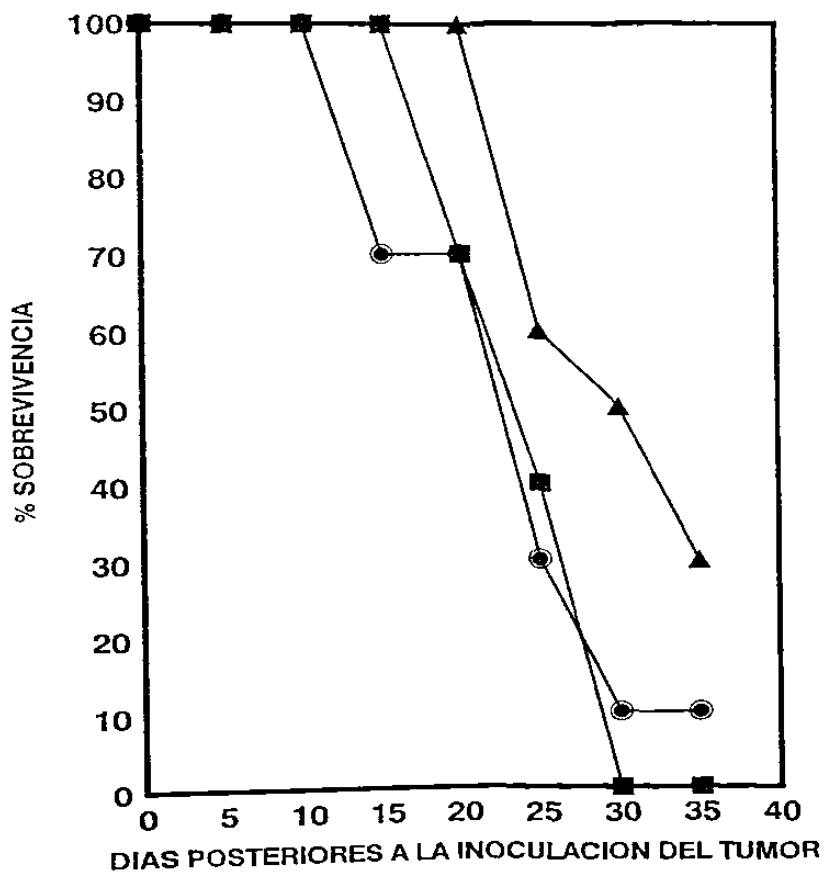


Figura No. 4 Efecto de la IL-2 intravenosa en ratones BALB/c con linfoma L-5178Y. Las dosis probadas fueron 20000 U (▲), 40000 U (■) y 80000 U (●), así como un grupo control (○), de todos los cuales se monitoreo la sobrevivencia en un período de 30 días posteriores a la inoculación del tumor.

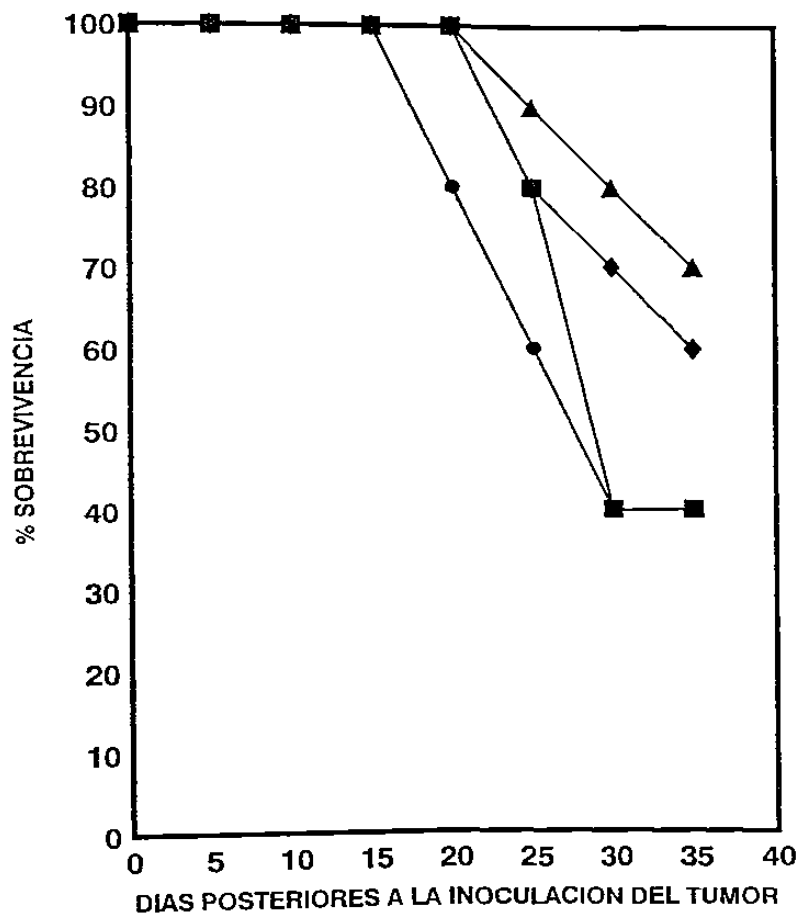


Figura No. 5 Efecto de diferentes dosis de IL-2 intravenosa en ratones BALB/c con linfoma L-5178Y. Los tratamientos corresponden a 20000 U (▲), 10000 U (■) y 5000 U (◆). El resultado de el grupo control (●) se registró también hasta los 30 días posteriores a la inoculación del tumor.

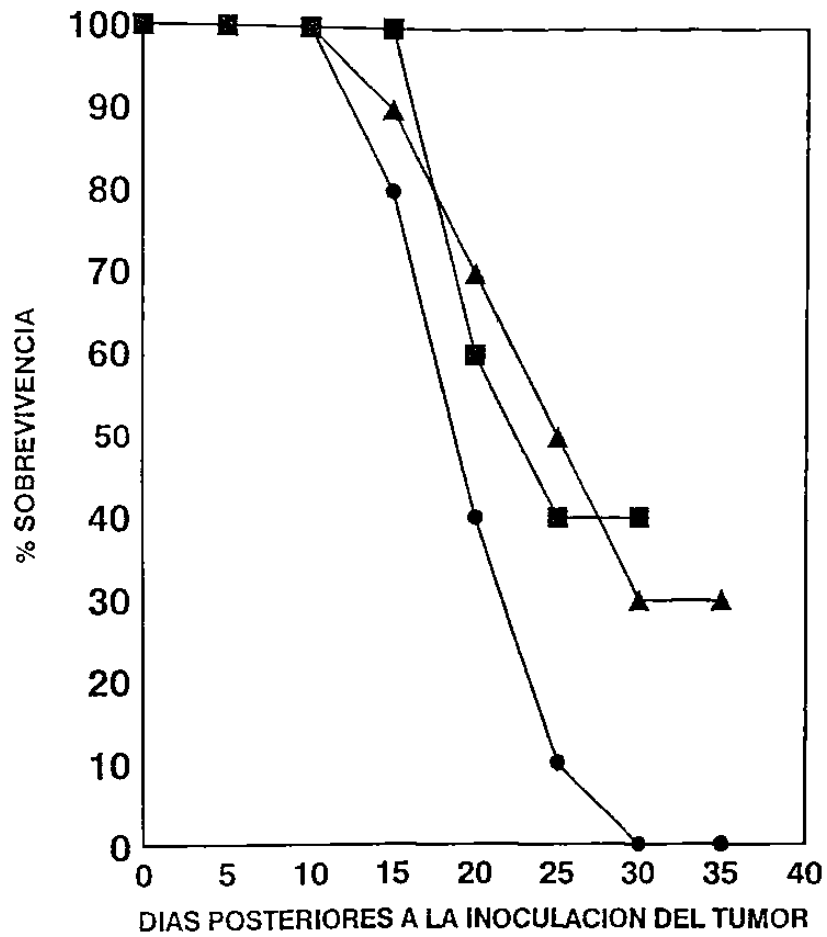


Figura No. 6 Efecto de 20000 U de IL-2 libre y liposomal vía intravenosa en ratones BALB/c con linfoma L-5178Y. La dosis probada fué inoculada por vía intravenosa en forma libre (▲) y liposomal (■). También fue monitoreado el grupo control (●) en un periodo de 30 días posteriores a la inoculación del tumor.

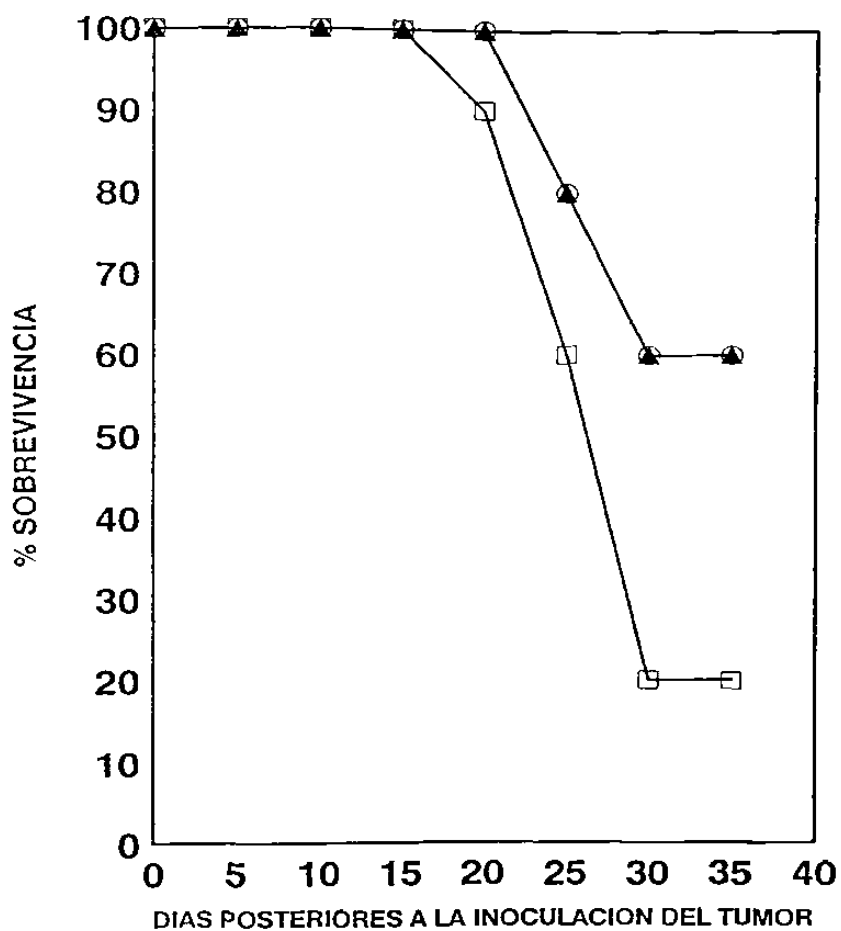


Figura No. 7 Efecto de 20000 U de IL-2 libre y liposomal vía intratumoral en ratones BALB/c con linfoma L-5178Y. La sobrevivencia en los grupos que recibieron los tratamientos con IL-2 en forma libre (▲) y atrapada en liposomas (○) fue analizado junto con el comportamiento registrado por el grupo control (□).

1020118499

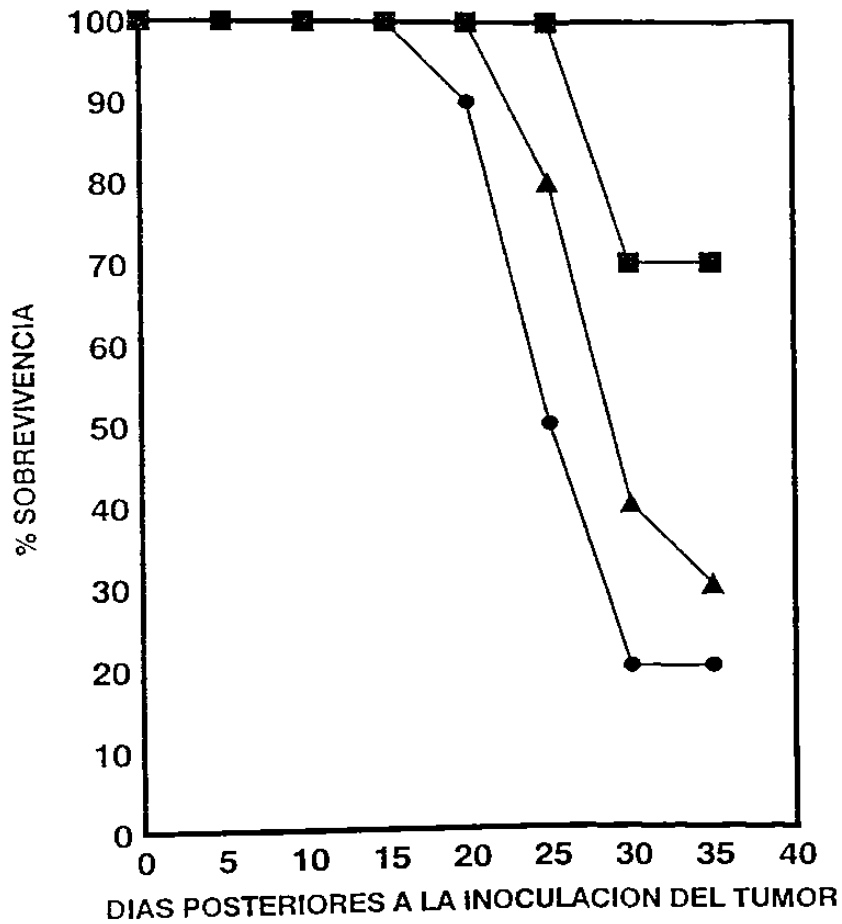


Figura No. 8 Efecto de 5000 U de IL-2 libre y liposomal vía intravenosa en ratones BALB/c con linfoma L-5178Y. La sobrevivencia en los grupos que recibieron los tratamientos con IL-2 en forma libre (▲) y atrapada en liposomas (■) fue analizado junto con el comportamiento registrado por el grupo control (●) hasta 30 días posteriores a la inoculación del tumor.

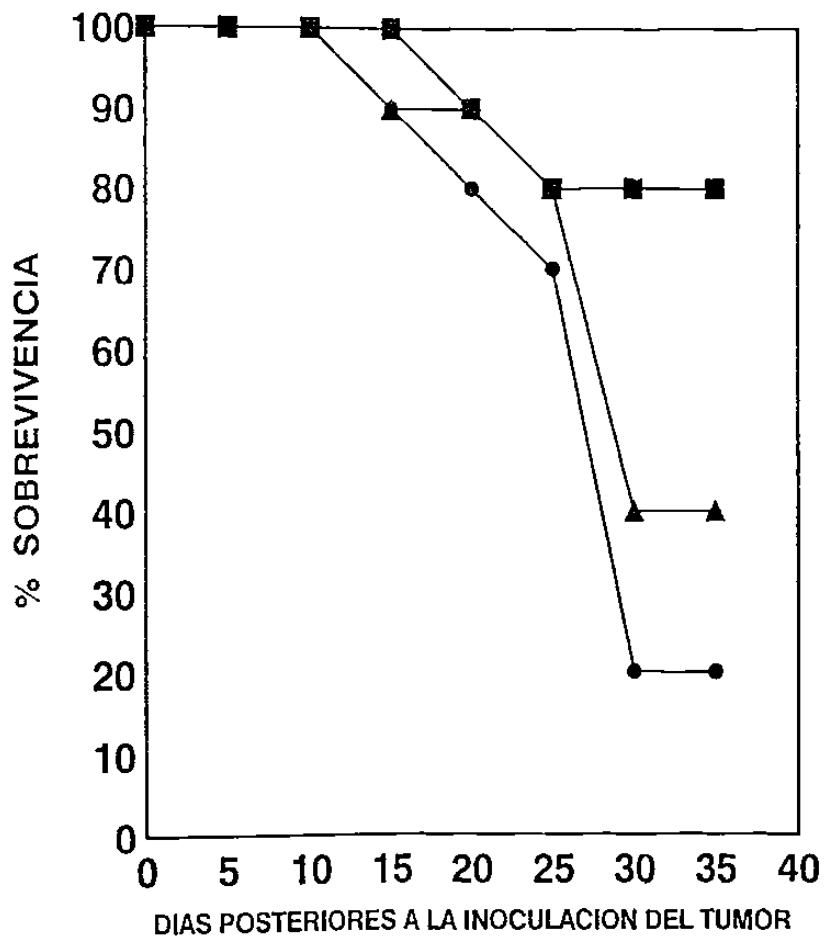


Figura No. 9 Efecto de 5000 U de IL-2 libre y liposomal vía intratumoral en ratones BALB/c con linfoma L-5178Y. La sobrevivencia en los grupos que recibieron los tratamientos con IL-2 en forma libre (▲) y atrapada en liposomas (■) fue analizado junto con el comportamiento registrado por el grupo control (●) hasta 30 días posteriores a la inoculación del tumor.

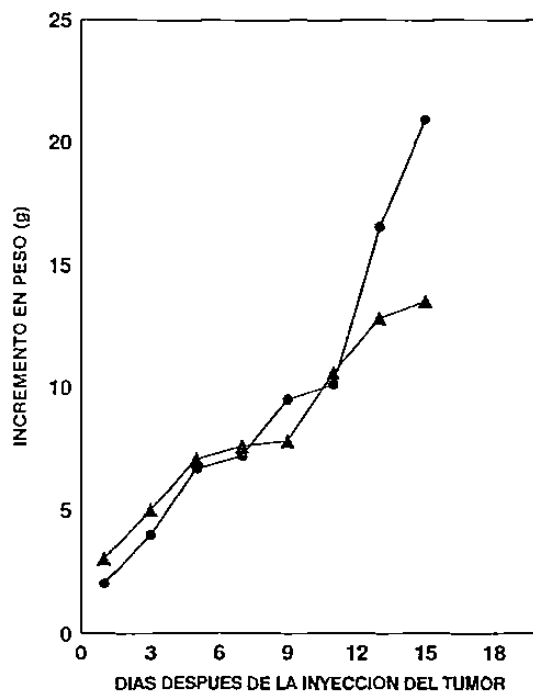


Figura No. 10 Monitoreo del peso de ratones BALB/c con linfoma L-5178Y tratados con 5000 U de IL-2 liposomal vía intratumoral. Se determinó el incremento en peso registrado por el grupo que recibió tratamiento (▲) con 5000 U de IL-2 vía i.t, así como un grupo control (●) en un período de 18 días posteriores a la inoculación del tumor.

TRATAMIENTO	DOSIS	VIA DE ADMINISTRACION	% DE SOBREVIVENCIA AL DIA 30 DESPUES DE INOCULADO EL LINFOMA L-5178Y
IL-2 LIBRE	80000 U	i.v.	10
IL-2 LIBRE	40000 U	i.v.	20
IL-2 LIBRE	20000 U	i.v.	30
IL-2 LIBRE	10000 U	i.v.	40
IL-2 LIBRE	5000 U	i.v.	30
IL-2 LIBRE	20000 U	i.t.	60
IL-2 LIBRE	10000 U	i.t.	70
IL-2 LIBRE	5000 U	i.t.	40
IL-2 LIPOSOMAL	40000 U	i.v.	60
IL-2 LIPOSOMAL	20000 U	i.v.	40
IL-2 LIPOSOMAL	5000 U	i.v.	70
IL-2 LIPOSOMAL	20000 U	i.t.	60
IL-2 LIPOSOMAL	5000 U	i.t.	80

Tabla No.7 Efecto de diferentes dosis y vías de administración de IL-2 en la sobrevivencia de ratones portadores del linfoma L-5178Y.

Gen	Ratones Normales		Ratones Control				Ratones Tratados con 5000 U de IL-2 en Liposomas			
	Bazo	Tejido	Bazo		Tumor		Bazo		Tumor	
			15 d	30 d	15 d	30 d	15 d	30 d	15 d	30 d
IL-12	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
IL-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
G3PDH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla No. 8 Expresión local y sistémica de citoquinas encontrada en ratones BALB/c tratados con IL-2 recombinante atrapada en liposomas.

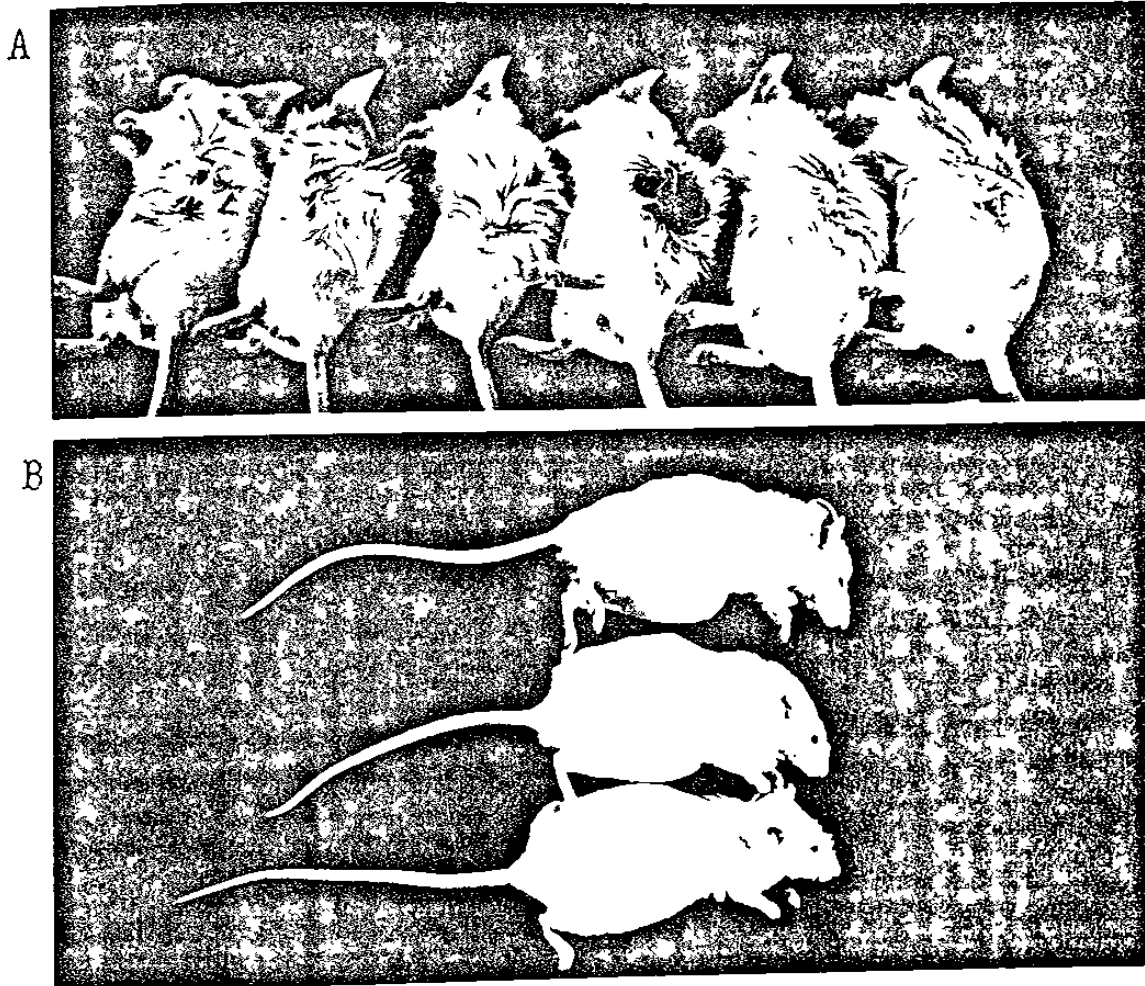


Figura No. 11 Efecto antitumoral de la Interleucina-2 recombinante atrapada en liposomas. A) Inyección subcutánea de 2.5×10^6 células del linfoma L-5178Y tratados con 5000 U de IL-2 9 días después por vía intratumoral (20 días después de la inoculación del tumor). (B) Inyección subcutánea de 2.5×10^6 células del linfoma L-5178Y (20 días después de la inoculación del tumor).

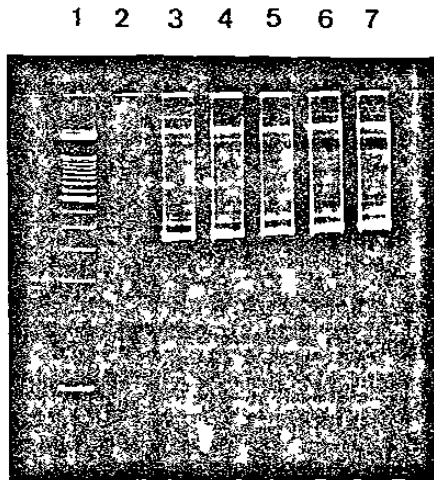


Fig. No. 12 Expresión de G3PDH en bazo y tumor de ratones tratados con IL-2 recombinante en liposomas. Expresión de G3PDH (540 pb). Marcadores (1), control negativo (2), bazo a los 30 dias despues de la inoculacion del tumor sin tratamiento (3) y bazo a los 15 dias (4), bazo a los 30 dias (5), tumor a los 15 dias (6) tumor a los 30 dias (7) de los ratones tratados. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.

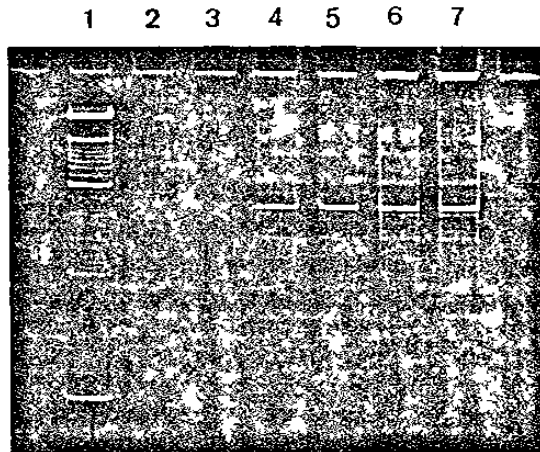


Fig. No. 13 Expresión local y sistémica de IL-12 en ratones tratados con IL-2 recombinante en liposomas. Expresión de IL-12 (420 pb). Marcadores (1), control negativo (2), bazo a los 30 dias despues de la inoculacion del tumor sin tratamiento (3) y bazo a los 15 dias (4), bazo a los 30 dias (5), tumor a los 15 dias (6) tumor a los 30 dias (7) de los ratones tratados. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.

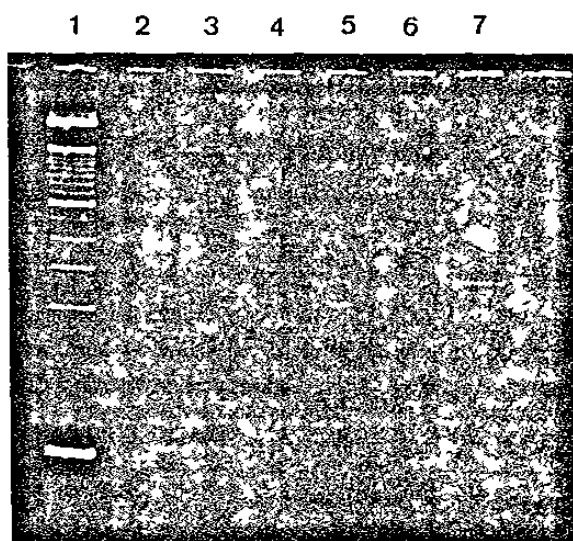


Fig. No. 14 Expresión local y sistémica de IL-4 en ratones tratados con IL-2 recombinante en liposomas. Expresión de IL-4 (388 pb). Marcadores (1), control negativo (2), bazo a los 30 dias despues de la inoculacion del tumor sin tratamiento (3) y bazo a los 15 dias (4), bazo a los 30 dias (5), tumor a los 15 dias (6) tumor a los 30 dias (7) de los ratones tratados. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.

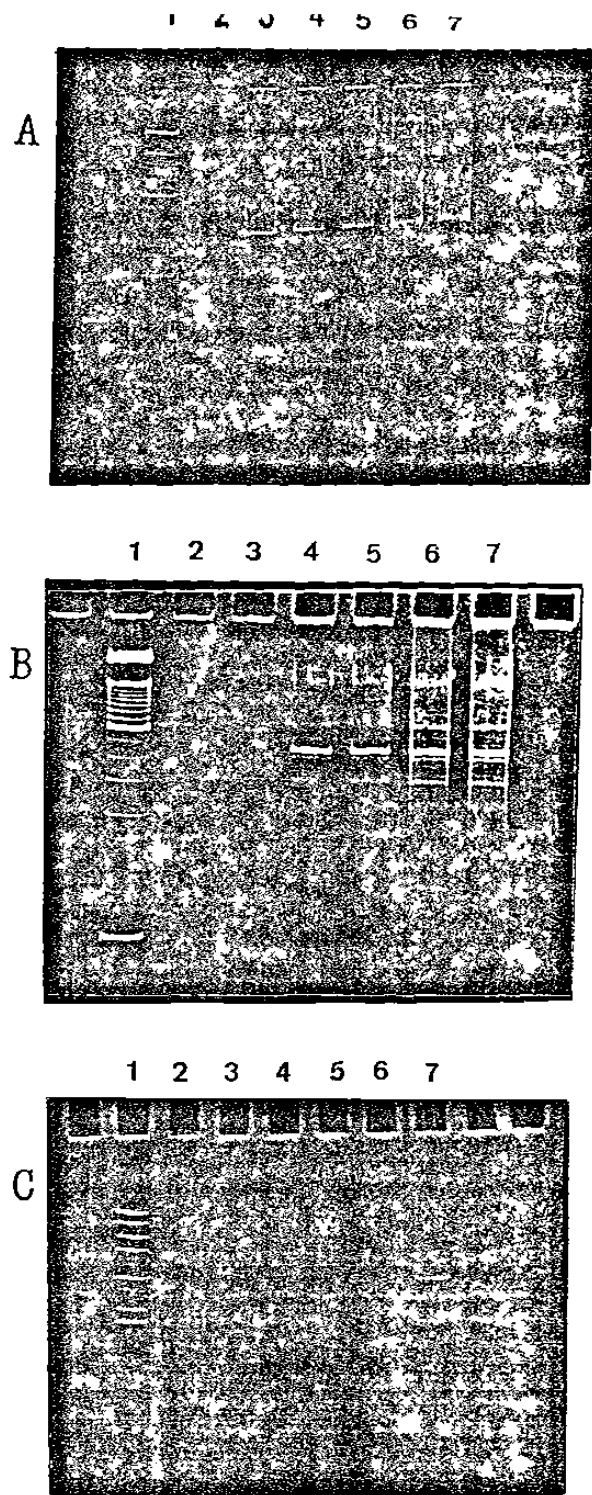


Fig. No. 15 Expresión local y sistémica de citoquinas en ratones tratados con IL-2 recombinante en liposomas. (A) Expresión de G3PDH (540 pb), (B) expresión de IL-12 (420 pb), (C) expresión de IL-4 (388 pb). Marcadores (1), control negativo (2), bazo a los 30 días despues de la inoculación del tumor sin tratamiento (3) y bazo a los 15 días (4), bazo a los 30 días (5), tumor a los 15 días (6) tumor a los 30 días (7) de los ratones tratados. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.

DISCUSION

La interleucina-2 recombinante es una de las citoquinas más ampliamente utilizadas en la inmunoterapia de tumores sólidos, dada su capacidad de activar algunos sistemas citotóxicos antitumorales del huésped. Los estudios clínicos de Fase I, II y III que se han realizado indican que la IL-2 presenta un efecto antitumoral importante únicamente en esquemas de dosis que generalmente producen efectos tóxicos. Debido a esta toxicidad elevada es necesario desarrollar estrategias para disminuir dichos efectos, manteniendo o aumentando la actividad antitumoral. Algunas de las perspectivas que están en desarrollo para obtener mayor seguridad y efectividad en esta terapia son las siguientes:

- A).- Asociar los tratamientos convencionales con la inmunoterapia .
- B).- Administrar diferentes combinaciones de citoquinas.
- C).- Investigar otras formas de administración, por ejemplo : vías diferentes, dosis menores e infusiones constantes.
- D).- Desarrollar vehículos especializados que incrementen su potencial inmunoterapéutico, disminuyendo la toxicidad, por ejemplo, los liposomas.
- E).- Asociar diferentes fármacos con inmunoterapia para disminuir toxicidad.

El uso de liposomas como un sistema de control de liberación para drogas citotóxicas, antibióticos y citoquinas ha sido utilizado para incrementar su actividad biológica y reducir los efectos tóxicos sistémicos inherentes a ellos.

La IL-2 recombinante humana tiene una solubilidad limitada a pH neutro y una vida media corta en circulación. Por lo tanto para alcanzar los niveles terapéuticos son requeridas administraciones continuas de altas dosis de IL-2, lo que con frecuencia resulta en toxicidad severa. Estos problemas pueden ser disminuidos por el atrapamiento de esta citoquina en liposomas.

En estudios *in vitro* y en modelos animales se ha encontrado que algunas citoquinas en acarreadores (como la IL-2, Interferón y el Factor de Necrosis Tumoral) han reducido sus

niveles de toxicidad y han incrementado los efectos antitumorales por sobre los mismos agentes libres.

La IL-2 se ha incorporado en liposomas con el propósito de modificar su farmacocinética, por ejemplo Anderson y col. encontraron que la incorporación de IL-2 en liposomas modifica significativamente su distribución y produce menos efectos tóxicos, dado que la administración de IL-2 libre a una dosis de 0.24×10^6 U/kg/día por infusión continua durante 15 días produce toxicidad severa y muerte, mientras que no hubo toxicidad cuando se aplicó una dosis de 0.3×10^6 U/Kg/día de IL-2 atrapada en liposomas. Para producir signos de toxicidad y cambios patológicos con la IL-2 atrapada en liposomas se requirió una dosis 7.5 veces mayor en comparación con la IL-2 libre (5).

La farmacocinética de la IL-2 es notablemente modificada cuando se atrapa en liposomas, Anderson y col. han encontrado que el tiempo medio de eliminación en el peritoneo de 50,000 U de IL-2 libre es de 24 min., mientras que el tiempo medio de eliminación de la IL-2 atrapada en liposomas del mismo sitio es de 4.3 horas (6).

Por lo que respecta a la potenciación de la actividad antitumoral de la IL-2 recombinante atrapada en liposomas Loeffler y col. encontraron que la administración diaria de 50,000 U de IL-2 en liposomas durante 5 días en combinación con 1×10^8 linfocitos T activados produce un 90 % de reducción de las metástasis hepáticas ocasionadas con el adenocarcinoma de colon MCA-38, mientras que no se encontró ningún efecto con la misma dosis de IL-2 libre, ni con los linfocitos T citotóxicos (41). Este estudio muestra que los liposomas incrementan el efecto antitumoral de la IL-2 recombinante ya que 250,000 U de IL-2 atrapada en liposomas fueron requeridas para producir un efecto antitumoral, esta dosis difiere significativamente de la requerida para producir un efecto antitumoral en nuestro trabajo donde con 5,000 U se obtuvieron significativos efectos antitumorales, esto probablemente se deba al modelo de tumor estudiado (eliminación de metástasis), forma de administración y la preparación de IL-2 recombinante utilizada.

Por su parte Kedar y col. han comparado la actividad antitumoral de la IL-2 libre, IL-2 pegializada (formulada en polietilenglicol, PEG) y la IL-2 atrapada en liposomas de larga circulación (estabilizados estericamente) en ratones con el carcinoma metastásico M109, la IL-2 formulada en PEG y liposomas mostraron igual efecto antitumoral, solamente que la primera produjo signos de toxicidad en los ratones ; nuevamente se requirieron 250,000 U de IL-2 en liposomas administradas en dos dosis de 125,000 U para producir un efecto antitumoral, por abajo de estas dosis no se observó ningún efecto significativo (32). La diferencia más importante con nuestro trabajo es que la administración de IL-2 en liposomas es por vía i.v. o i.p., por lo que puede ser la razón principal por la que se requieran dosis muy altas para producir un efecto antitumoral, otros estudios llevados a cabo con IL-2 en liposomas en tumores subcutáneos, metástasis hepáticas o pulmonares han demostrado que la IL-2 es más efectiva terapéuticamente cuando es administrada localmente, intracavitariamente o regionalmente, pero no cuando es administrada sistémicamente (6,41,32,38,80).

También se han confirmado estos hallazgos utilizando otros sistemas de liberación local de citoquinas ; por ejemplo, otros grupos han demostrado que se incrementa la actividad *in vivo* de la IL-2 unida a matrices sólidas o geles, usados como sistema de liberación lenta, los cuales fueron mucho más potentes cuando se administraron en la proximidad del tumor. (18,32,46,48).

Por otro lado, Neville y col. han evaluado la posibilidad de inducir un estado de inmunid protectora antitumoral contra un melanoma B16 no inmunogénico usando IL-2 atrapad. en liposomas. Ellos encontraron que con la administración intratumoral de 1×10^6 U de IL-2 libre no se tiene ningún efecto, pero con 3.4×10^6 U se produce un 73 % de protección. Con la administración intratumoral de 4×10^4 U de IL-2 en liposomas obtienen un 70 % de protección. En este modelo de protección contra un tumor no inmunogénico la IL-2 atrapada en liposomas fue 85 veces más potente que la IL-2 libre por vía intratumoral . Aunque en un modelo de tumor diferente, nosotros hemos encontrado datos semejantes, por

ejemplo, con 4×10^4 U de IL-2 en liposomas por vía intratumoral se obtuvo un 60 % de supervivencia, mientras que con 5,000 U de IL-2 atrapada en liposomas por vía intratumoral se produce un 80 % de supervivencia. En nuestro modelo de estudio la IL-2 atrapada en liposomas fue 50 veces más potente que la IL-2 libre por la vía intratumoral (Tabla No.7).

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento con IL-2 atrapada en liposomas han encontrado que se mejora la actividad antitumoral de la IL-2 recombinante, pero el mecanismo preciso de este efecto antitumoral de la IL-2 en liposomas no ha sido determinado. Todos los estudios enfatizan que el incremento en la actividad antitumoral se debe principalmente a una disminución de los efectos tóxicos, por una modificación de la biodistribución de la IL-2 y por retardar su liberación en el sitio de aplicación. Nosotros encontramos que el efecto antitumoral de la IL-2 atrapada en liposomas puede deberse a la inducción de la expresión sistémica y local de la IL-12 a los 15 y 30 días después de aplicado el tumor.

La IL-12, es una citoquina producida por los linfocitos B y los macrófagos activados, y se ha reportado que presenta significativos efectos antitumorales en varios modelos de tumores murinos. El mecanismo de acción de la actividad antitumoral inducido por la IL-12 no está completamente comprendido, aunque algunas de sus propiedades pueden ser un requisito para este fenómeno. Se ha demostrado que la IL-12 incrementa directamente la proliferación y el potencial citotóxico de las células NK, células T y células LAK (76). Se ha demostrado también que la IL-12 sinergiza con la IL-2 en la inducción de otras citoquinas (como Interferón- γ) en las células T y NK, sugiriéndose que esta citoquina puede mediar los efectos sinérgicos observados en la citotoxicidad. (75).

En el efecto antitumoral parece participar también la expresión de la IL-4, la cual es producida por la otra subpoblación de células T, las TH2. El resultado de el análisis de esta citoquina fue que su expresión solo se detectó en el tejido tumoral de los ratones tratados con la IL-2, a los 30 días, pero no se observó expresión a los 15 días en tejido tumoral, ni en

bazo. La IL-4 es un producto de células T CD4+ y ha demostrado estar involucrada en la regulación de la respuesta inmune. Estudios recientes han demostrado que la IL-4 juega un papel importante en la supresión del crecimiento de tumores (72). Se ha encontrado que la IL-4 producida por linfocitos presentes en el sitio del tumor induce inmunidad sistémica en modelos murinos de ciertos cánceres.

El desarrollo de una respuesta inmune efectiva a un tumor involucra una cascada de eventos, incluyendo el reconocimiento de antígenos asociados a tumor, la inducción de una respuesta inmune y la eliminación del tumor por células efectoras inmunes. Se ha demostrado que la respuesta inmune por parte de las células T a los tumores es el tipo de inmunidad predominante para mediar la regresión de tumores establecidos y que dos de las citoquinas más importantes en el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral son la IL-4 e IL-12 (70).

CONCLUSIONES

- 1 -Se desarrolló un linfoma subcutáneo (L-5178Y) en ratones BALB c que puede ser utilizado como modelo de cáncer experimental.
- 2 - Se desarrolló un procedimiento para la producción de liposomas unilamelares conteniendo IL-2 recombinante.
- 3 -La administración de dosis altas de IL-2 recombinante (10000-40000 U) en ratones con linfoma subcutáneo produce efectos tóxicos, debido a que acelera la muerte de los ratones.
- 4 -La IL-2 recombinante (5000 U) atrapada en liposomas unilamelares tanto por vía i.v como local presenta una actividad antitumoral mayor que la IL-2 libre contra el linfoma subcutáneo.
- 5 -La IL-2 recombinante produce un mejor efecto antitumoral contra el linfoma subcutáneo cuando es administrada localmente.
- 6 -El efecto antitumoral de la IL-2 atrapada en liposomas puede ser debido a la expresión local de IL-4 e IL-12 , las cuales pueden inducir la activación de linfocitos T citotóxicos específicos contra el tumor.

PERSPECTIVAS

Este estudio demuestra que una única administración de IL-2 en liposomas produce un significativo efecto antitumoral contra el linfoma subcutáneo en ratones BALB/c. El mecanismo por el cual se produce este efecto antitumoral parece ser debido a la expresión local de IL-4 e IL-12. Dichas citocinas potencialmente pueden inducir la activación de linfocitos T citotóxicos específicos contra el tumor. Estos datos nos permiten proponer lo siguiente :

- 1.- Analizar el efecto antitumoral de varias dosis continuas de IL-2 recombinante en liposomas.
- 2.- Analizar los mecanismos de respuesta antitumoral inducidos por la administración de IL-2 recombinante en liposomas.
 - a) Inducción de CTL
 - b) Inducción de LAK
 - c) Inducción de Citoquinas TH1 y TH2
- 3.- Analizar el efecto antitumoral producido por la combinación de varias citoquinas recombinantes en liposomas. Por ejemplo : IL-2 + IL-12 en liposomas ó IL-2 + IL-15 en liposomas.
- 4.- Analizar el efecto antitumoral producido por la expresión local del gene de IL-2 por medio del uso de los liposomas como vectores de información genética.
- 5.- Realizar un estudio de Fase I en pacientes con tumores sólidos avanzados para determinar la factibilidad de la aplicación clínica de la IL-2 recombinante en liposomas.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas. A.K. ; Lichtman, A.H. and J. S. Pober. (1991). Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Co. pp 236-352.
2. Adler, A. ; Schachter, J. ; Barenholz, Y. ; Bar, L.K. ; Klein, T. ; Korytnaya, R. ; Sulkes. A. ; Michowiz, R. ; Cohen, Y. and I. Kedar. (1996). Allogeneic human liposomal melanoma vaccine with or without IL-2 in metastatic melanoma patients : clinical and immunobiological effects . *Cancer-Biother.* 10(4) :293-306.
3. Allavena. P. ; Damia. G. ; Colombo, T. ; Maggioli, D. ; D'Incalci, M. and A. Mantovani. (1989). Lymphokine-activated killer (LAK) and monocyte-mediated cytotoxicity on tumor cells lines resistant to antitumor agents. *Cell. Immunol.* 120:250-58.
4. Allen,T.M.; Hansen,C.B. and L.S. Guo. (1993). Subcutaneous administration of liposomes: a comparison with the intravenous and intraperitoneal routes of injection. *Biochim-Biophys-Acta.* 1150(1):9-16.
5. Anderson, P.M. ; Hasz, D. ; Dickrell, L.and S. Sencer. (1992). Interleukin-2 in liposomes : Increased intravenous potency and less pulmonary toxicity in the rat. ; *Drug Dev. Res.* 27 :15-31.
6. Anderson, P.M. ; Katsanis, E. ; Leonard, A.S. ; Schow, D. ; Loeffler, C.M. ; Goldstein. M.B. and A.C. Ochoa. (1990). Increased local antitumor effects of interleukin-2 liposomes in mice with MCA-106 sarcoma pulmonary metastasis. *Cancer - Res.* 50(6):1853-6.
7. Anderson. P.M. and M.A. Sorenson. (1994). Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin -2. *Clin-Pharmacokinet.* 27(1):19-31.

8. Backer, W.J.S. and F.H. Roendkin. (1986). Antimicrobial chemotherapy directed by liposomes . *J. Antimicrobial . Chemotherapy*. 17:547.
9. Balemans , L.T.M. ; Mattijssen, V. ; Steerenberg, P.A. ; Van Driel, B.E.M. ; De Mulder and W. Den Otter. (1993). Locoregional therapy with polyethylene glycol-modified interleukin-2 of an intradermally growing hepatocellular carcinoma of the guinea pig induces T-cell mediated antitumor activity. *Cancer -Immunol.-Immunother*. 33 :7-14.
10. Balemans L.T.M. ; Steerenberg, P.A. ; Koppenhagen, F.J. et. al. (1994). PEG-IL-2 therapy of advanced cancer in the guinea pig. Impact of the primary tumor and beneficial effects of cyclophosphamide. ; *Int-J-Cancer*. 58 :871-6.
11. Ballas. Z.K. and W. Rasmussen. (1987). Characterization of LAK precursors and susceptible target cells within the murine thymus. *J. Immunol*. 139(10):3542-49.
12. Bergers, J.J. ; Den-Otter, W.; Dullens, H.F. ; Kerkvliet, C.T. and D.J. Crommelin. (1993). Interleukin-2 containing liposomes: interaction of interleukin-2 with liposomal bilayers and preliminary studies on application in cancer vaccines. *Pharm-Res*. 10(12):1715-21.
13. Caligiuri, M.A. (1993). Low-dose recombinant interleukin-2 therapy: rational and potential clinical applications. *Semin-Oncol*. 20 (6 Suppl 9):3-10.
14. Cesario, T.C. ; Vaziri, N.D. ; Ulich, T.R. ; Khamiseh, G. ; Oveisi, F. ; Rahimzadeh, M. ; Yosefi, S. and M.R. Pandian. (1991). Functional biochemical and histopathologic consequences of high-dose interleukin-2 administration in rats. *J-Lab-Clin-Med*. 118(1):81-8.

- 15.Chomezynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 51(3):532-35.
- 16.Chong, A.S.F. ; Hersh, E.M. and W.J. Grimes. (1988). Blocking of lymphokine activated killer (LAK) cell mediated cytotoxicity by cell-sized beads bearing tumor cell proteins. *Cancer-Res*. 44 :18-24.
- 17.Connor, J.; Bannerji, R.; Saito, S.; Heston, W.; Fair, W. and E. Gilboa. (1993). Regression of bladder tumors in mice treated with interleukin 2 gene-modified tumor cells. *J-Exp-Med*. 177(4):1127-34.
- 18.Crum, E.D. and D.R. Kaplan. (1991). In vivo activity of solid phase interleukin-2. *Cancer Res*. 51 :875-9.
- 19.Deehan, D.J.; Heys, S.D.; Simpson, W.G.; Broom, J.; Franks, C. and O. Eremin. (1994). In vivo cytokine production and recombinant interleukin 2 immunotherapy: an insight into the possible mechanisms underlying clinical responses. *Br-J-Cancer*. 69(6):1130-5.
- 20.DeVita, V.T. (1983). Progres in cancer management. Keynote Address. *Cancer*. 51:2401-2409.
- 21.Foa, R.; Cignetti, A.; Riera, L.; Gillio-Tos, A. and A. Guarini. (1994). Cytokine gene therapy in oncology. *Folia-Biol-Praha*. 40(1-2):37-84.
- 22.Guleira, A.S. ; Yang, J.C. ; Topalian, S.L. ; Weber, J.S. ; Parkinson, D.R. ; MacFarlane, M.P. ; White, R.L. ; Steinberg, S.M. ; White, D.E. ; Einhorn, J :H. ; et-al. (1994). Renal dysfunction associated with the administration of high-dose interleukin-2 in 199 consecutive patients with metastasic melanoma or renal cell carcinoma. *J-Clin-Oncol*. Dec ; 12(12) :2714-22.

23. Gregoriadis, G. (1985). Liposomes for drug and vaccines trends in biotechnology. *Invest-New-Drugs*. 3(9):235.
24. Hawkins, M.J. ; Atkins, M.B. ; Dutcher, J.P. ; Fisher, R.I. ; Weiss, G.R. ; Margolin, K.A. ; Rayner, A.A. ; Sznol, M. ; Parkinson, D.R. ; Paietta, E. ; et-al.. (1994). A phase II clinical trial of interleukin-2 and lymphokine activated killer cells in advanced colorectal carcinoma. *J-Immunother*. Jan .15(1) :74-8.
25. Hay, R.; Caputo, J.; Chen, T.R.; Macy, M.; McClintock, P. and Y. Reidy. (1992). Catalogue of Cells Lines Hybridoma. 7a De. *American Type Collection*. U.S.A. pp 168.
26. Ho, S.P. ; Kramer, K.E. and W.B. Ershler. (1990). Effect of host age upon interleukin-2 mediated antitumor responses in a murine fibrosarcoma model. *Cancer-Immunol-Immunother*. 31(3):146-50.
27. Hofmockel, G. ; Theiss, M. ; Bussen, D. ; Wirth, M.P. and H.G. Frohmuller. (1994). Treatment of advanced renal cell carcinoma with subcutaneous administration of interleukin-2 and interferon-alpha. *Urologe-A*. Sep, 33(5) :434-9.
28. Iigo, M. ; Nishikata, K. and A. Hoshi. (1990). Effects of recombinant interleukin-2, recombinant interferon-beta, and recombinant tumor necrosis factor on subcutaneously implanted adenocarcinoma 755 and Lewis Lung Carcinoma. *J-Biol-Response-Mod*. 9(4):426-30.
29. Iigo, M.; Sakurai, M. ; Tamura, T; Saijo, N. and A. Hoshi. (1987). *In vivo* antitumor activity of multiple injections of recombinant interleukin-2 alone and in combination with three different types of recombinant interferon, on various syngeneic murine tumors. *Cell. Immunol*. 11 :23-27.

30. Joffret, M.L. ; Morgueaux, S. ; Laclerc, C. ; Oth, D. ; Zanetti, C. ; Sureau, P. and P. Perrin. (1990). Enhancement of interleukin-2 activity by liposomes. *Vaccine*. **8**(4):385-9.
31. Kaye, S.B. (1981). Liposome-problems and promises as selective drug carriers. *Cancer Treatment. Review*. **8**:27.
32. Kedar, E. ; Braun, E. ; Rutkowski, Y. ; Emanuel, N. and Barenholz, Y. (1994). Delivery of cytokines by liposomes. II. Interleukin-2 encapsulated in long-circulating sterically stabilized liposomes : Immunomodulatory and anti-tumor activity in mice., *J-Immunother*. **16** :115-124.
33. Kedar, E. ; Rutkowski, Y. ; Braun, E. ; Emanuel, N. and Barenholz, Y. (1994). Delivery of cytokines by liposomes. I. Preparation and characterization of interleukin-2 encapsulated in long-circulating sterically stabilized liposomes. *J-Immunother*. **16** :47-59.
34. Khanna, Ch. ; Hasz, D.E. ; Klausner, J.S. and P.M. Anderson. (1996). Aerosol delivery interleukin 2 liposomes is nontoxic and biologically effective : canine studies. *Clinical Cancer Research*. **2** :721-734.
35. Kim, H. ; Rosenberg, S.A. ; Steinberg, S.M. ; Cole, D.J. and J.S. Weber. (1994). A randomized double-blinded comparison of the antiemetic efficacy of ondansetron and droperidol in patients receiving high-dose interleukin-2. Im *J-Immunother-Emphasis-Tumor-Immunol*. Jul ; **16**(1) :60-5
36. Knauf, M.J. ; Bell, D.P. ; Hirtzer, P. ; Luo, Z.P. Young, J.D. and N.V. Katre. (1988). Relationship of effective molecular size to systemic clearance in rats of recombinant interleukin-2 chemically modified with water-soluble polymers. *J. Biol. Chem*. **263** :15064-70.

37. Konno, H. ; Mardo, Y. and A.F. Martin. (1992). Effect of liposomal interleukin-2 on ascites forming rat hepatoma. *J. Surg. Oncol.* 51 :33-7.
38. Konno, H. ; Yamashita, A. ; Tadakuma, A. and S. Sakaguchi. (1991). Inhibition of growth of rat hepatoma by local injection of liposomes containing recombinant interleukin-2. Antitumor effect of IL-2 liposome. *Biotherapy.* 3(3):211-8.
39. Lafreniere, R. ; Rosenstein, M.S. and S.A. Rosenberg. (1986). Optimal methods for generating expanded lymphokine activated killer cells capable of reducing established murine tumors *in vivo*. *J. Immunol.* 94:37-49.
40. Lissoni, P. ; Barni, S. ; Tisi, E. ; Rovelli, F. ; Pittalis, S. ; Rescaldani, R. ; Vigore, L. ; Biondi, A. ; Ardizzoia, A. and G. Tancini. (1993). In vivo biological results of the association between interleukin-2 and interleukin-3 in the immunotherapy of cancer. *Eur-J-Cancer.* 29A(8) :1127-32.
41. Loeffler, C.M. ; Jeffrey, P.L. ; Anderson, P.M. ; Katsanis, E. ; Ochoa, J.B. ; Urba, W.J. ; Longo, D.L. ; Leonard, A.S. y Ochoa, A.C. (1991). Antitumor effects of interleukin 2 liposomes and anti-CD3-stimulated T-cells against murine MCA-38 hepatic metastasis. *Cancer-Res.* 51(8) :2127-32.
42. Loeffler, C.M. ; Platt, J.L. and P.M. Anderson. (1991). Antitumor effects of interleukin 2 liposomes and anti-CD-3 stimulated T-cells against murine MCA-38 hepatic metastases. *Cancer Res.* 51 :2127-32.
43. Luo, L. (1991). The anti-tumor efficacy of natural killer (NK) cells and interleukin-2 against experimental pulmonary metastasis in rats. *Chung-Kuo-I-Hsueh-Ko-Hsue-Yuan-Hsue-Pao.* 13(4):238-7.

44. Maierhofer, G. (1985). Liposomes: preparation and applications. *American Laboratory*. Oct. p.129.
45. Marincola, F.M. ; Da-Pozzo-L. F. ; Drucker, B.J. and W.D. Holder. (1990). Adoptive immunotherapy of human pancreatic cancer with lymphokine activated killer cells and interleukin-2 in a nude mouse model. *Surgery*. 108(5):919-29.
46. Matsuoka, J. ; Sakagami, K. and K. Higaki. (1993). Site directed immunotherapy by intratumoral administration of slow delivery system of interleukin 2 : a pilot study in 14 breast cancer patients. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 12 :288.
47. Mattijssen, V. ; Balemans, L.T. ; Steerenberg, P.A. and P.H.M. De Mulder. (1992). Polyethylene-glycol-modified interleukin-2 is superior to interleukin-2 in locoregional immunotherapy of established guinea pig tumors. *Int-J-Cancer*. 51 :812-7.
48. Morikawa, K. ; Okada, F. ; Hosakawa, M. and H. Kobayashi. (1987). Enhancement of therapeutic effect of recombinant interleukin-2 on a transplantable rat fibrosarcoma by the use of a sustained release vehicle, pluronic gel. *Cancer Res*. 47 :37-41.
49. Nakajima, F.; Khanna, A.; Xu, G.; Lagman, M.; Haschemeyer, R.; Mouradian, J.; Wang, J.C.; and K.H. Stenzel. (1994). Immunotherapy with anti-CD3 monoclonal antibodies and recombinant interleukin-2: stimulation of molecular programs of cytotoxic killer cells and induction of tumor regression. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. 91(17):7889-93.
50. Nakajima, Y. ; Okuno, K. ; Ohnishi, H. ; Shilayama, Y. ; Nakamura, T. ; Hirohata, T. and M. Yasutomi (1990). Induction of lymphokine activated killer (LAK) and prolongation of its activity by intrasplenic injection of interleukin-2 (IL-2) in combination with tumor necrosis factor (TNF). *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 91(10):1548-53.

51. Oldham, R.K. (1984). Biologicals and biological modifiers: fourth modality of cancer treatment. *Cancer Treatment Reports* . **68**(1).
52. Owen, L.B.; Loudon, W.G.; Yagita, M. and E.A. Grimm. (1988). Functional differentiation of human lymphokine-activated killing (LAK) is distinct from expansion and involves dissimilar interleukin-2 receptors. *Cell. Immunol.* **11**:235-46.
53. Pineda, G.R. (1988). Biología Molecular de la Interleucina-2. *Infectología.* **8**(2):73-93.
54. Pockaj, B.A. ; Topalian, S.L. ; Steinberg, S.M. ; White, D.E. and S.A. Rosenberg. (1993). *J-Clin-Oncol.* Jan **11**(1) :136-47.
55. Quan, W.D. Jr ; Dean, G.E. ; Lieskovsky, G. ; Mitchell, M.S and R.A. Kempf . (1994). Phase II study of low dose cyclophosphamide and intravenous interleukin-2 in metastatic renal cancer. *Invest-New-Drugs.* **12**(1) :35-9.
56. Ratain. M.J. ; Priest, E.R. ; Janisch, L. and N.J. Vogelzang. (1993). A phase I study of subcutaneous recombinant interleukin-2 and interferon alfa-2a. *Cancer.* Apr **1** .**71**(7) :2371-6.
57. Ravaud, A. ; Negrier, S. ; Cany, L. ; Merrouche, Y. ; Le-Guillou, M. ; Blay, J.Y. ; Clavel, M. ; Gaston, R. ; Oskam, R. and T. Philip. (1994). Subcutaneous low-dose recombinant interleukin-2 and alpha-interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br-J-Cancer.* Jun .**69**(6) :1111-4.
58. Raymond, E. ; Boaziz, C. ; Komarover, H. ; Breau, J.L. ; Moliard, M. ; Morere, J.F. and L. Israel. (1993). Cancer of the kidney : changes in blood lymphocyte subsets induced by treatment with interferon alpha-2b and interleukin-2r. *Bull-Cancer-Paris.* Apr .**80**(4) :299-309.

- 59.Reiner, S.L. ; Zheng, S.; Corry, D.B. Corry and R.M. Lucksley. (1993). Constructing polycompetition cDNA for quantitative PCR. *J. Immunol. Methods*. 165:37-46.
- 60.Roder, J.C.; Lohmann, M.; Domzing,W.; Kiessling, R. and O. Haller. (1979). A functional comparison of tumor cell killing by activates macrophages and natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 9:283-88.
- 61.Rodolfo, M. ; Salvi, C. ; Bassi, C. and G. Parmiani. (1990). Adoptive immunotherapy of a mouse colon carcinoma with recombinant interleukin-2 alone or combined with lymphokine activated killer cells or tumor immune lymphocytes. Survival benefit of adjuvant post-survival treatment and comparison with experimental metastasis model. *Cancer -Immunol-Immunother.* 31(1):28-36.
- 62.Rodolfo. M. ; Salvi. C. ; Bassio, C. ; Rovetta, G. ; Melani, C. ; Colombo, M.P. and G. Parmiani. (1991). Adyuvant adoptive immunotherapy with IL-2 and lymphocytes from tumor-bearing mice: *in vitro* tumor--stimulated lymphocytes are more effective than LAK cells. *Nat-Immun-Cell-Growth-Regul.* 10(6):308-19.
- 63.Rodolfo, M. ; Sakvi, C. ; Bassi, C. ; Sensi, M. and G. Parmiani. (1990). Adoptive immunotherapeutic treatment with interleukin-2 in a mouse colonic adenocarcinoma model. *Ann-Ist-Super-Sanita.* 26(3-4):423-32.
- 64.Rosenberg. S.A. ; Yang, J.C. ; Topalian, S.L. ; Schwartzenruber, D.J. ; Weber, J.S. ; Parkinson, D.R. ; Seipp, C.A. ; Einhorn, J. H. and D.E. White. (1994). Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA.* Mar23-30 . 271(12) :907-13.
- 65.Shulman, K.L. ; Thompson, J.A. ; Benyunes, M.C. ; Winter, T.C. and A. Fefer. (1993). Adverse reaction to intravenous contrast media in patients treated with interleukin-2. *J. Immunother.* Apr . 13(3) :208-12.

- 66.Sosman, J.A. ; Fisher, S.G. ; Kefer, C. ; Fisher, R.I. and T.M. Ellis. (1994). A phase I trial of continuous infusion interleukin-4 (IL-4) alone and following interleukin-2 in cancer patients. *Ann-Oncol. May* . 5(5) :447-57.
- 67.Sparano, J.A. ; Fisher, R.I. ; Sunderland, M. ; Margolin, K. ; Ernest, M.L. ; Sznol, M. ; Atkins, M.B. ; Dutcher, J.P. ; Micetich, K.C. ; Weiss, G.R. ; et-al. (1993). Randomized phase III trial of treatment with high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alfa-2a in patients with advanced melanoma. *J-Clin-Oncol. Oct* ; 11(10) :1969-77.
- 68.Steerenberg. P.A. ; Balemans, L.T.M. ; Kremer, B.A. ; Koppenhagen, F.J. ; De Mulder, P.H and W. Den Otter. (1995). Reduction of therapeutic efficacy by second cycle of PEG-IL-2. *J. Immunother.* 18(1) :45-51
- 69.Stein, R.C. ; Malkovska, V. ; Morgan, S. ; Galazka, A. ; Aniszewski, C. ; Roy, S.E. ; Shearer, R.J. ; Mardsen, R.A. ; Bevan, D. and E.C. Gordon. (1991). The clinical effects of prolonged treatment of patients with advanced cancer with low-dose subcutaneous interleukin-2. *BrJ-Cancer.* 63(6) :275-8.
- 70.Strome , S.E. ; Chang, A.E. ; Shu, S. and J.C. Krauss. (1995). Secretion of both IL-2 and IL-4 by tumor cells results in rejection and immunity. *J. Immunother* 19(1) :21-32.
- 71.Subiza, J.L. ; Gil, J. y M.T. Medina. (1994). Inmunoterapia del cáncer : nuevas estrategias experimentales. *Inmunología.* 13(1) :1-10.
- 72.Suminami, Y. ; Elder, E.M. ; Lotze, M.T. and T.L. Whiteside. (1995). In situ Interleukin-4 gene expression in cancer patients treated with genetically modified tumor vaccine. *J-Immunother.* 17(4) :238-248.

73. Swenson, C.E. ; Popesca, M.C. and R. S. Ginsberg (1988). Preparation and use of liposomes in the treatment of microbiology infections. C.R.C. *Review in Microbiology Suppl.* 1:51.
74. Sznol, M. and D.R. (1994). Clinical applications of IL-2. *Oncology-Huntingt.* 8(6):61-7.
75. Tandon, P. ; Wu, D. ; Crim, J.A. ; Mostowski, H.S. and J.P. Siegel . (1993). Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 151(5) : 2444-2452.
76. Tannenbaum, Ch. S. ; Wicker, N. ; Armstrong, D. ; Tubbs, R. ; Finke, J. ; Bukowski, R. and T. A. Hamilton. (1996). Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12. *J. Immunol.* 156 :693-699.
77. Toshitani, A. ; Taniguchi, K. ; Himeno, K ; Kawano, Y. and K. Nomoto. (1988). Adoptive transfer of H-2 incompatible lymphokine activated killer (LAK) cells: an approach for successful cancer immunotherapy. Free from Graft-versus host disease (GVHD) using murine models. *Cell. Immunol.* 115:373-82.
78. Uchiyama, A. ; Hoon, D.S.; Morisaki, T.; Kaneda, Y.; Yuzuki, D.H. and D.L. Morton. (1993). Transfection of interleukin 2 gene into human melanoma cells augments cellular immune response. *Cancer-Res.* 53(5):949-52.
79. Utsugi, T. ; Dinney, C.P. ; Killion, J.J. ; Brown, D. and J.J. Fidler. (1991). *In situ* activation of mouse lung macrophages by co-administration of liposomes containing the lipopeptide CGP 31362 and interleukin-2 involves interaction with T lymphocytes in natural killer cells . *Lymphokine-Cytokine-Res.* 10(6):487-93.
80. Vaage, J. and E. Mayhew. (1991). Immunotherapy of a mouse mammary carcinoma by sustained peritumor release of IL-2. *Int. J. Cancer.* 47 :582-5.

81. Vujanovic, N.L.; Yasumura, S. and H. Hirabayashin. (1995). Antitumor activities of subsets of human IL-2 activated natural killer cells in solid tissues. *J. Immunol.* 154(1):281-9.
82. White, R.L. Jr.; Schwartzentruber, D.J.; Guleria, A.; MacFarlane, M.P.; White, D.E.; Tucker, E. and S.A. Rosenberg. (1994). Cardiopulmonary toxicity of treatment with high-dose interleukin-2 in 199 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *Cancer*. Dec 15 . 74(12) :3212-22.
83. Weinstein, J.N. (1984). Liposomes as drug carriers in cancer therapy. *Cancer Treat. Report.* 68(1):127.
84. Yang, S.C.; Fry, K.D.; Grimm, E.A. and J.A. Roth. (1991). Phenotype and cytotoxic activity of mouse tumor-Bearer splenocytes and tumor-infiltrating lymphocytes from K-1735 melanoma metastasis following anti-CD-3 interleukin-2 and tumor necrosis factor- α combination immunotherapy. *J-Immunother.* 10(5):326-35.
85. Yang, J.C.; Schwarz, S.L.; Perry D.M. and S.A. Rosenberg. (1991). Murine studies using polyethylene glycol modified recombinant human interleukin-2 (PEG-IL-2): antitumor effects of PEG-IL-2 alone and in combination with adoptive cellular transfer. *Lymphokine-Cytokine-Res.* 10 :475-80.
86. Zimmerman, R.J.; Aukerman, S.L.; Katre, N.V.; Winkelhake, J.L. and J.D. Young. (1989). Schedule dependency of the antitumor activity and toxicity of polyethylene glycol modified interleukin-2 in murine tumor models. *Cancer-Res.* 49 :6521-8.

